



HAL
open science

Identification de biomarqueurs biochimiques des états de mal épileptiques

Aurélie Hanin

► **To cite this version:**

Aurélie Hanin. Identification de biomarqueurs biochimiques des états de mal épileptiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS235 . tel-03847894

HAL Id: tel-03847894

<https://theses.hal.science/tel-03847894>

Submitted on 10 Nov 2022

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.

Thèse de doctorat de Sorbonne Université

École doctorale Cerveau, Cognition, Comportement

Identification de biomarqueurs biochimiques des états de mal épileptiques

Présentée par **Aurélié Hanin**

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITE
Spécialité Neurosciences

Soutenue publiquement le 05 Novembre 2021, devant un jury composé de :

Pr. Romain Sonnevile, Professeur des Universités (Université de Paris)	Président
Pr. Viviane Bouilleret, Professeur des Universités (Université Paris-Saclay)	Rapporteur
Pr. Nicolas Gaspard, Professeur des Universités (Université Libre de Bruxelles)	Rapporteur
Pr. Jean-Louis Beaudeau, Professeur des Universités (Université de Paris)	Examineur
Dr. Fanny Mochel, Maître de conférences (Sorbonne Université)	Examineur
Pr. Marianne Renner, Professeur des Universités (Sorbonne Université)	Examineur
Pr. Vincent Navarro, Professeur des Universités (Sorbonne Université)	Directeur de thèse

Remerciements

A mon directeur de thèse et aux membres de mon jury, ...

Mes premiers remerciements vont tout naturellement à Vincent Navarro, mon directeur de thèse. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée pour la réalisation de mon master 2 puis tout au long de ces quatre années de thèse. Je te remercie de m'avoir laissé une grande autonomie pour l'élaboration et la réalisation de nos différents projets. Merci pour ton soutien infaillible, ta bienveillance et ta générosité. Je suis ravie que cette thèse ne soit qu'une première étape dans notre travail ensemble.

Je tiens à remercier le Pr. Viviane Bouilleret et le Pr. Nicolas Gaspard qui ont accepté de juger mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je suis ravie de pouvoir discuter de mes travaux avec vous.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Pr. Romain Sonnevile qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse et pour ses conseils lors de mes comités de suivi de thèse.

J'exprime ma profonde reconnaissance au Pr. Jean-Louis Beaudoux pour ses conseils avisés tout au long de ma thèse, son aide pour les multiples demandes de financement et sa bienveillance pour l'organisation de la suite de mon parcours.

J'adresse mes vifs remerciements au Dr. Fanny Mochel et au Pr. Marianne Renner qui ont accepté d'examiner mes travaux.

Aux collègues et amis du laboratoire, ...

Merci Stéphane pour ton accueil chaleureux et tes conseils tout au long de cette thèse, dont je sais le sujet et les méthodes éloignés de tes habitudes de recherche !

Merci Paul, mon « binôme » de master et de thèse. Félicitations pour ta thèse, tu peux être super fier ! Je te remercie pour ton soutien et pour ton aide tout au long de cette aventure, pour m'avoir appris à relire un EEG chez la souris et pour toutes ces heures passées dans la salle de perfusion (on ne les compte même plus !!).

Merci Virginie pour m'avoir initiée à la relecture des tracés de monitoring EEG en réanimation et pour les longues heures passées à scorer nos patients ! Merci de m'avoir intégrée aux discussions sur les patients en état de mal et dans tes projets cliniques.

Merci Mario pour m'avoir fait découvrir le monde du machine learning, pour ta disponibilité et ta bonne humeur permanente !

Merci Valério et Louis, les piliers des signatures de consentement, pour votre disponibilité et votre gentillesse ! J'ai été ravie de vous retrouver au laboratoire après notre passage simultané à Alajouanine.

Merci Sarah pour toute l'aide « immunohistologique » que tu m'as rendue pendant ces cinq ans au laboratoire (et les 150 cerveaux que je t'ai donnés à couper), pour ta gentillesse et l'intérêt que tu as porté à mon projet.

Merci Séverine pour ta gentillesse et ta disponibilité pendant toutes ces années.

Merci Delphine pour avoir satisfait toutes nos envies sur le modèle kaïnate ! J'espère que tu ne garderas pas un trop mauvais souvenir de ces bi-implantations hippocampiques ! Je te remercie pour le temps passé en chirurgie et ton aide précieuse pour notre essai thérapeutique.

Merci Elisa pour ton aide pour la réalisation des western blot.

J'ai également une pensée pour tous les autres membres actuels et passés du laboratoire : Adrien, Antoine, Bertrand, Katia, Laurent, Manon, Mark, Sandrine, Sofia, Stephen, et nos stagiaires Clément, Fanny, Louise, Martin, Philippe, Pierre, Rémy, ..., pour les bons moments partagés. Je suis consciente de la chance que j'ai eu de travailler avec chacun d'entre vous.

Enfin je remercie l'équipe de Richard Miles et particulièrement David Luis et Farah Chali pour avoir débuté ce projet et pour leur aide et conseils.

Je remercie également la Fondation pour la Recherche Médicale pour m'avoir fait confiance en m'accordant un poste de thèse pendant trois ans ainsi que l'ensemble du personnel de l'ICM pour son aide quotidienne.

Aux équipes cliniques,

Je tiens à remercier Sophie Demeret pour son accueil, ses conseils et pour m'avoir permis de réaliser ce projet et d'inclure des patients dans son service. Merci également à l'ensemble de l'équipe de neuroréanimation, Albert, Benjamin, Clémence, Loïc, Nicolas, Pierre, les internes et infirmières pour leur soutien et pour avoir rendu ces études possibles ! Merci à Meriem pour ta présence ces derniers mois et pour reprendre le flambeau des inclusions !

J'ai également une pensée pour les équipes des unités d'épilepsie et de neurophysiologie clinique.

Merci Mariella pour m'avoir formée pendant mon M2 au recrutement des patients et pour tes encouragements tout au long de ma thèse.

Merci Vi-Huong pour ta gentillesse et pour m'avoir intégrée à des projets éloignés de mon background initial !

Je remercie l'ensemble de la « team Alajouanine », les internes et chefs de clinique qui se sont succédés toutes ces années (Bastien, Nicolas, Laurent), les infirmières, Isabelle, sans qui ces projets n'auraient pas pu être concrétisés. Je remercie tout particulièrement Aurore et Gwen qui m'ont permis d'économiser du temps précieux lors des dernières inclusions. Et j'ai bien entendu une pensée pour Ana et Sophie Dupont qui m'ont initiée au monde de l'épileptologie pendant mon stage d'externat (il y a déjà 6 ans) et qui m'ont donné envie de revenir dans l'équipe !

Je remercie également l'ensemble de l'équipe de l'unité EEG pour leur accueil, leur disponibilité et leur intérêt pour mes recherches.

Je tiens également à remercier les équipes de la consultation de neurologie, de la réanimation médicale, de la réanimation cardiologie, de neurochirurgie et des urgences pour leur participation à nos projets.

Enfin, je tiens à remercier les patients qui ont accepté de participer à nos protocoles de recherche.

Aux équipes des départements de Biochimie métabolique et Biochimie Endocrinienne et Oncologique, ...

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à Dominique Bonnefont-Rousselot pour son accueil au sein du département de Biochimie métabolique et pour m'avoir permis d'utiliser les appareils du département pour effectuer mes dosages. Je vous remercie pour votre soutien et vos conseils tout au long de ma thèse et pour votre aide pour tracer la suite de mon parcours.

Je remercie Foudil Lamari pour m'avoir initiée au monde de la spectrométrie de masse et pour son aide pour établir les meilleurs protocoles d'analyse ! Merci de m'avoir permis de passer de longues séries en dépit d'un programme de masse toujours surchargé !

Je tiens à remercier Randa Bittar pour son intérêt de longue date pour ce projet de recherche. Merci de nous avoir proposé toujours de nouvelles analyses et de nous avoir fait bénéficier des dernières innovations de l'équipe !

Je remercie Jérôme Denis pour sa gentillesse, ses conseils et sa disponibilité. Merci pour ton enthousiasme et ta bonne volonté pour réaliser des suivis de NSE toujours plus prolongés !

Je remercie également Françoise Imbert-Bismut pour son accueil et sa gentillesse et Benoît Rucheton pour m'avoir permis d'intégrer la progranuline à nos analyses. Merci également aux autres biologistes avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger toutes ces années et qui ont facilité la réalisation de ces études, et notamment Rana Alkouri, Maguy Bernard et Christine Brochet.

Enfin, je tiens à exprimer ma reconnaissance à l'ensemble de l'équipe des techniciens de laboratoire pour leur aide et leur participation à ces études. Je remercie particulièrement Corinne et Valérie de l'équipe « lipides » pour leur gentillesse et leur disponibilité et Jean-Louis, Magda, Odile, Pascale et Patricia de l'équipe « masse » pour leur aide quand la masse faisait des siennes et pour avoir facilité la réalisation de mes dosages en adaptant parfois leurs séries aux miennes ! Je remercie également Imen pour avoir géré pendant plusieurs années la biobanque des échantillons, pour m'avoir transmis une base de données biologiques complète qui a grandement facilité mes recherches pendant les premiers mois de mon M2 et pour ses conseils pour la réalisation des analyses.

A ceux qui ont eu un rôle déterminant dans le déroulement de mes études et mes choix d'orientation, ...

Au Pr. Didier Bouhassira pour m'avoir permis de réaliser mon premier stage de recherche dans le Centre d'Évaluation et de Traitement de la Douleur à l'Hôpital Ambroise Paré, pour m'avoir fait découvrir la recherche clinique et m'avoir donné l'envie de travailler en neurosciences.

Au Dr. Bassem Chaaban pour sa gentillesse, sa bienveillance, sa présence et ses conseils ces sept dernières années.

Au Pr. Catherine Marchand-Leroux pour ses enseignements en pharmacologie. Je vous remercie pour m'avoir permis de réaliser une mission d'enseignement parallèlement à ma thèse et pour la confiance que vous m'avez accordée.

Au Dr. Amélie Liou pour m'avoir permis de réaliser mon externat en pharmacie au sein de l'Unité d'Épilepsie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière et avoir encouragé la suite de mon parcours.

A mes proches, ...

A ma famille, et plus particulièrement ma mère Dominique, mon frère Cyril, mon beau-père Edmond, et notre mascotte Narnia, pour leur soutien infaillible et leur présence pendant toutes ces années.

A mes meilleures amies et « jumelles » de parcours, Alice et Marie. Je suis ravie d'avoir partagé toutes ces années avec vous, et je vous accueillerai avec grand plaisir de l'autre côté de l'Atlantique pour continuer à partager du temps ensemble.

A mes amis des études de pharmacie, et particulièrement Alexia, Déborah, Gratiane, Jézékael, Magali, Malek, Marianne, Pauline, Noémie.

A Morgane, pour ces quelques années de lycée passées ensemble. Félicitations pour ta réussite et bon courage pour la suite !

A mes amis du tennis de table qui m'ont accompagnée toutes ces années,

Merci Michael pour ta gentillesse et tes encouragements permanents.

Merci Marion de m'avoir suivie dans mon aventure boulonnaise, pour ces moments passés lors de nos multiples week-end de déplacements.

Merci Sylvain pour les bons moments partagés.

Merci Xavier pour ta présence et bon courage pour la suite de ta thèse.

Summary

Status epilepticus (SE) is a life-threatening prolonged epileptic seizure that occurs in approximately 30,000 people in France each year. Around 25% of SE are refractory to adequate antiepileptic drugs. The excessive and sustained activation of neurons induced by seizures or SE recurrence, especially in hippocampal structures, may lead to excitotoxic processes, neuronal death and neuroinflammation. The resulting brain injury may be followed by subsequent neurological sequels, with inconsistent recovery after several months.

The objectives of my thesis work were (i) to confirm the diagnostic value of previously suggested biochemical biomarkers, (ii) to study their capability to reflect the EEG activity and to monitor the risk of seizure recurrence, (iii) to identify new pathophysiological pathways involved in SE excitotoxicity, (iv) to propose a new neuroprotective therapy and (v) to apply a data driven approach using machine learning models to identify outcome predictive markers.

I first found an increase of S100-beta protein levels in the serum of SE patients and I defined a diagnostic threshold at 0.09 ng/mL allowing to conclude accurately to SE for nearly 84% of the patients. Although I also found increased Neuron Specific Enolase (NSE) levels in SE patients, this enzyme seems to have a mainly interest for the follow-up of refractory SE patients. Indeed, I further found that serum NSE levels were positively correlated with two EEG scores able to assess the seizure risk recurrence and that 80% of patients for whom NSE increased of more than 15% between two successive measures presented with seizures in the next 24 hours.

Thirdly, I evidenced, by a translational and multimodal approach, that SE is followed by disturbances in cholesterol homeostasis. 24-hydroxycholesterol levels were decreased in kainic acid mouse hippocampus and in human plasma and post-mortem brain tissues of patients with SE. The decrease of 24-hydroxycholesterol levels was followed by an increase of the cholesterol synthesis, both in the brain and in the peripheral compartment, and by a brain cholesterol accumulation. Our study paves the way for researches on cholesterol-lowering therapies as therapeutic intervention, in order to prevent the excitotoxicity, related to the cholesterol accumulation, and possibly the subsequent neurological sequels of SE patients.

I found that a daily administration of simvastatin after the induction of SE, by an intrahippocampal injection of kainic acid in mice, significantly reduced the neuronal loss and the gliosis, emphasizing the neuroprotective value of simvastatin in SE.

Finally, I applied machine learning models to predict accurately the outcome for all hospitalized SE patients and at different time points. I proposed two clinico-biological tools able to predict the bad outcome and one biological tool able to predict with a good accuracy the risk of mortality at discharge. I provided, for the first time, a clinico-biological score able to predict the degree of worsening induced by SE. In addition, I also provided for the first time a tool allowing the prediction of recovery at long-term for 91% of the patients and the prediction of persistent disability for 83% of the patients.

My thesis work highlighted the interest of biochemical biomarkers to help in diagnosing SE, to monitor SE patients over time and to predict SE outcome. In addition, it highlighted the importance of better understanding pathophysiological pathways involved in SE excitotoxicity in order to provide new neuroprotective therapies.

Keywords: Biomarkers; Cholesterol; Neuron Specific Enolase; Prognosis; S100-beta protein; Status epilepticus

Préface

L'épilepsie est l'une des maladies neurologiques les plus fréquentes et affecte près de 1% de la population mondiale, soit plus de 50 millions de personnes (Meyer et al. 2010). Les états de mal épileptiques (EME), résultats de la pérennisation d'une crise d'épilepsie, en sont la forme la plus sévère et constituent l'une des principales urgences neurologiques. En dépit d'une prise en charge thérapeutique adaptée, près d'un tiers des patients présentent un EME réfractaire aux traitements épileptiques (Marawar et al. 2018). La persistance des crises expose ces patients au risque d'excitotoxicité et de mort neuronale, à l'origine de séquelles neurologiques irréversibles, du développement d'une épilepsie séquellaire et d'une mortalité rapportée entre 5% et 46% (Leitinger et al. 2019). D'importants efforts doivent être faits afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de contrôler les EME réfractaires, et de réduire les séquelles neurologiques. L'identification de biomarqueurs composites (biochimiques, cliniques et électroencéphalographiques) pourraient aider les cliniciens à poser un diagnostic rapide d'EME, à identifier son étiologie, à évaluer le degré de souffrance cérébrale des patients et à estimer leur pronostic neurologique.

Si le diagnostic des EME et le suivi des patients reposent, actuellement, majoritairement sur l'évaluation clinique et la réalisation d'électroencéphalogrammes, de nombreux biomarqueurs biochimiques ont été suggérés ces vingt dernières années pour optimiser le diagnostic des EME, identifier leur étiologie, ou aider à l'évaluation pronostique des patients. Cependant, aucun biomarqueur biochimique n'est aujourd'hui validé pour la prise en charge des EME, principalement en raison de résultats obtenus sur des cohortes de trop faible effectif.

Mon travail de thèse a eu pour objectifs : **(i) de valider la valeur diagnostique des biomarqueurs biochimiques les plus prometteurs sur une grande cohorte de patients, (ii) d'étudier leur capacité à refléter les anomalies électroencéphalographiques et à prédire la récurrence de crise, (iii) d'identifier de nouvelles voies physiopathologiques pouvant expliquer les conséquences délétères des EME, (iv) de proposer une stratégie thérapeutique de neuroprotection et de l'évaluer dans un modèle murin d'EME et (v) d'étudier, à l'aide d'outils d'intelligence artificielle, l'intérêt de scores composites clinico-biologiques pour optimiser l'évaluation pronostique des patients présentant un EME.**

Sommaire

Remerciements	3
Summary	9
Préface	11
Sommaire	13
Table des figures	17
Table des tableaux	19
Liste des abréviations, sigles et acronymes	21
Introduction	23
Partie 1. Les états de mal épileptiques (EME)	23
1. Définitions des états de mal épileptiques	23
1.1. Évolution de la définition des EME	23
1.2. Les EME réfractaires, super-réfractaires, et prolongés super-réfractaires	25
2. Épidémiologie des états de mal épileptiques	26
2.1. Incidence	26
2.2. Facteurs de risque	27
3. Diagnostic positif des états de mal épileptiques	27
3.1. Nouvelle classification des EME	27
3.2. Critères diagnostiques consensuels des EME non convulsifs	29
4. Diagnostic étiologique des états de mal épileptiques	30
4.1. Les principales étiologies	30
4.2. Modalités diagnostiques	32
5. Prise en charge thérapeutique des états de mal épileptiques	33
5.1. Prise en charge spécifique des EME	33
5.2. Prise en charge thérapeutique des EME super-réfractaires	39
6. Évaluation pronostique des états de mal épileptiques	41
6.1. Les facteurs de risque de mortalité et de morbidité	41
6.2. Scores pronostiques : STESS, mSTESS, EMSE et END-IT	44
Partie 2. Physiopathologie et biomarqueurs biochimiques des états de mal épileptiques	49
1. Physiopathologie et conséquences des états de mal épileptiques	49
1.1. Physiopathologie des EME	49
1.2. Conséquences précoces des EME	51
1.3. Conséquences tardives des EME	52
2. Biomarqueurs biochimiques des états de mal épileptiques	57
2.1. Les critères d'un bon biomarqueur biochimique	57
2.2. Intérêts des biomarqueurs biochimiques pour les EME	59
2.3. Quels biomarqueurs pour refléter les conséquences précoces et tardives des EME ?	61
2.4. Revue 1: Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus. Epilepsia.	66
Partie 3. Le métabolisme du cholestérol : une nouvelle piste de biomarqueurs pour les états de mal épileptiques	81
1. Le métabolisme du cholestérol	81
1.1. Homéostasie du cholestérol	81
1.2. Spécificité du cholestérol intracérébral	86
1.3. Modifications du métabolisme du cholestérol dans les maladies neurologiques	90
2. Quel est l'impact du cholestérol sur l'épilepsie ?	91
2.1. Conséquences d'une accumulation de cholestérol	91
2.2. Effets des traitements hypocholestérolémiants	93
3. Quel est l'impact de l'état de mal épileptique sur le métabolisme du cholestérol ?	96

Objectifs	99
Résultats	101
Partie 1. Validation du potentiel de la Neuron Specific Enolase, de la protéine S100-bêta et de la progranuline comme biomarqueurs des états de mal épileptiques.....	101
1. Intérêt de la Neuron Specific Enolase, de la protéine S100-bêta et de la progranuline pour le diagnostic positif et étiologique des états de mal épileptiques.....	101
1.1. Introduction.....	101
1.2. Démarche expérimentale.....	102
1.3. Résultats.....	102
1.4. Article 1 : Neuron Specific Enolase, S100-beta protein and progranulin as diagnostic and etiologic biomarkers of status epilepticus.....	103
2. La surveillance EEG continue, un outil indispensable à la prise en charge de l'état de mal épileptique réfractaire	123
2.1. Introduction.....	123
2.2. Démarche expérimentale.....	124
2.3. Résultats.....	124
2.4. Article 2 : Continuous EEG monitoring in the follow-up of convulsive status epilepticus patients: a proposal and preliminary validation of an EEG-based seizure build-up score (EaSiBUSSEs). Neurophysiologie Clinique – Clinical Neurophysiology.....	125
3. Une approche multimodale pour optimiser le suivi des patients et la prédiction du risque de récurrence de crise après un état de mal épileptique réfractaire.....	137
3.1. Introduction.....	137
3.2. Démarche expérimentale.....	137
3.3. Résultats.....	138
3.4. Article 3 : Serum Neuron Specific Enolase: a new tool for seizure risk monitoring after status epilepticus.	139
Partie 2. De nouveaux biomarqueurs des états de mal épileptiques.....	153
1. Une approche ciblée : le métabolisme du cholestérol intracérébral.....	153
1.1. Introduction.....	153
1.2. Démarche expérimentale.....	153
1.3. Résultats.....	154
1.4. Article 4 : Disturbances of brain cholesterol metabolism : a new excitotoxic process associated with status epilepticus. Neurobiology of Disease.	155
2. Une approche non ciblée : étude de métabolomique	173
2.1. Introduction.....	173
2.2. Démarche expérimentale.....	174
2.3. Résultats préliminaires.....	179
2.4. Discussion et perspectives.....	185
Partie 3. Les statines, une nouvelle stratégie de neuroprotection.....	187
1. Étude du potentiel neuroprotecteur et anticonvulsivant des statines dans un modèle murin d'état de mal épileptique.....	187
1.1. Introduction.....	187
1.2. Démarche expérimentale.....	188
1.3. Résultats préliminaires.....	190
1.4. Discussion et perspectives.....	195
Partie 4. Optimisation de l'évaluation pronostique des états de mal épileptiques par une approche multimodale	197
1. L'intelligence artificielle pour optimiser la prédiction de la mortalité, de la morbidité et de la récupération après un état de mal épileptique	197
1.1. Introduction.....	197
1.2. Démarche expérimentale.....	198
1.3. Résultats.....	198
1.4. Article 5 : Machine learning to predict mortality, morbidity and recovery after status epilepticus.	200

Discussion générale	227
1. Quelle place pour les biomarqueurs biochimiques dans le diagnostic positif et le suivi des patients en état de mal épileptique ?	227
1.1. Un biomarqueur diagnostique idéal ?	227
1.2. Un biomarqueur de suivi idéal ?	231
1.3. Comment intégrer les biomarqueurs biochimiques à la prise en charge clinique de l'état de mal épileptique ?	235
2. Quelle place pour les biomarqueurs biochimiques dans l'identification d'une stratégie de neuroprotection chez les patients en état de mal épileptique réfractaire ?	237
2.1. Inhibition de la synthèse du cholestérol, quels outils ?	237
2.2. Favoriser l'élimination du cholestérol, quelle place pour la thérapie génique ?	239
2.3. Favoriser l'estérification du cholestérol, quels outils ?	241
2.4. Inhibition du transport du cholestérol, quels outils ?	241
2.5. Comment intégrer le traitement hypocholestérolémiant à la prise en charge de l'état de mal épileptique ?	243
3. Quelle place pour les biomarqueurs biochimiques dans l'évaluation pronostique des patients en état de mal épileptique ?	245
3.1. L'intelligence artificielle en neuroréanimation	245
3.2. Apport des scores clinico-biologiques	246
3.3. Comment intégrer ces outils à la prise en charge clinique de l'état de mal épileptique ? ...	250
Conclusion et perspectives	253
Références	257
Annexes	281
Annexe 1	283
Article 6 : A severe form of epilepsy could be treated with cholesterol medication. New Scientist, 13 Novembre 2019.	283
Annexe 2	287
Article 7 : Association of Clinical, Biological, and Brain Magnetic Resonance Imaging Findings with Electroencephalographic Findings for Patients with COVID-19. JAMA Network Open.	287
Annexe 3	305
Article 8 : Older patients with COVID-19 and neuropsychiatric manifestations: study of risk factors for mortality.	305
Annexe 4	347
Article 9 : Epilepsy related to focal neuronal lipofuscinosis: extra-frontal localization, EEG signatures and GABA involvement.	347
Résumé	362

Table des figures

Figure 1 : Évolution des définitions des états de mal épileptiques au cours du temps.	24
Figure 2 : Incidence des différents types d'états de mal épileptiques.	26
Figure 3 : Algorithme pour le diagnostic étiologique des états de mal épileptiques.	33
Figure 4 : Schéma de prise en charge de l'état de mal épileptique tonico-clonique généralisé chez l'adulte.	38
Figure 5 : Algorithme décisionnel pour le score modifié de Rankin.	45
Figure 6 : EMSE, Epidemiology-based Mortality score in Status Epilepticus.	47
Figure 7 : Internalisation des récepteurs GABA-A.	50
Figure 8 : Évolution de l'IRM cérébrale d'une patiente présentant un état de mal réfractaire <i>de novo</i>	52
Figure 9 : Mort neuronale hippocampique dans les suites d'un état de mal épileptique.	53
Figure 10 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique.	55
Figure 11 : Rôle des leucocytes dans la rupture de la BHE et l'épileptogénèse.	55
Figure 12 : Gliose hippocampique dans les suites d'un état de mal épileptique.	56
Figure 13 : Conséquences précoces et tardives des états de mal épileptiques.	56
Figure 14 : Courbe ROC et distribution des résultats possibles d'un test.	57
Figure 15 : Sélection d'un seuil permettant une bonne sensibilité.	58
Figure 16 : Sélection d'un seuil permettant une bonne spécificité.	58
Figure 17 : Balance de risques crises/sédation après un état de mal épileptique.	60
Figure 18 : Voies de synthèse du cholestérol et régulation par les SREBP et les statines.	82
Figure 19 : Régulation de la localisation et de l'activité des SREBP par la protéine SCAP et les protéases S1P et S2P.	83
Figure 20 : Schéma d'une lipoprotéine.	84
Figure 21 : Métabolisme des lipoprotéines.	85
Figure 22 : Voies de synthèse du cholestérol.	86
Figure 23 : Métabolisme intracérébral du cholestérol.	87
Figure 24 : Mécanisme d'action des récepteurs LXR.	89
Figure 25 : Mort neuronale progressive suite à l'inhibition de la CYP46A1.	92
Figure 26 : Activité interictale enregistrée en CA3 après l'inhibition de la CYP46A1.	92
Figure 27 : Décharge critique enregistrée dans l'hippocampe injecté et les cortex ipsi et controlatéral.	93
Figure 28 : Modulation de la réponse glutamatergique induite par des changements de concentration en cholestérol.	94
Figure 29 : Analyses PCA.	179
Figure 30 : Analyses PLS-DA.	180
Figure 31 : Heatmap réalisée à partir des aires sous la courbe des 57 marqueurs significativement différents dans le LCR des patients en état de mal épileptique.	181
Figure 32 : Présentation des 25 voies les plus perturbées dans le sang et le LCR des patients en état de mal épileptique.	183
Figure 33 : Effet de la simvastatine sur l'émergence de l'état de mal épileptique et des crises spontanées.	192
Figure 34 : Effet de la simvastatine sur la mort neuronale et la gliose secondaires à l'état de mal épileptique.	194
Figure 35 : Bilan des stratégies thérapeutiques envisageables pour moduler le métabolisme du cholestérol dans les états de mal épileptiques.	242
Figure 36 : Modalités d'utilisation de la simvastatine dans l'état de mal épileptique.	244
Figure 37 : Quel(s) marqueur(s) pour quel(s) objectif(s) ?	254

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification des états de mal épileptiques selon l'axe sémiologie.	28
Tableau 2 : Classification des états de mal épileptiques selon l'axe étiologie.	28
Tableau 3 : Classification de certains états de mal épileptiques selon l'axe âge.	29
Tableau 4 : Critères de Salzburg : diagnostic des états de mal épileptiques non convulsifs.	30
Tableau 5 : Exemples d'étiologies d'état de mal épileptique de cause connue réparties selon les catégories de l'ILAE.	31
Tableau 6 : Étiologies les plus fréquentes des états de mal épileptiques.	32
Tableau 7 : Modalités d'utilisation de l'immunothérapie dans l'état de mal épileptique.	40
Tableau 8 : STESS, SStatus Epilepticus Severity Score.	44
Tableau 9 : mSTESS, modified SStatus Epilepticus Severity Score.	45
Tableau 10 : END-IT, Encephalitis, Nonconvulsive status epilepticus, Diazepam resistance, Image abnormalities and Tracheal intubation.	48
Tableau 11 : Composition des principales lipoprotéines.	84
Tableau 12 : Résultats détaillés des 15 voies majoritairement impactées par l'état de mal épileptique.	184
Tableau 13 : Effet de la simvastatine sur la survenue de l'état de mal épileptique.	190
Tableau 14 : Effet de la simvastatine sur la survenue des crises spontanées.	191

Liste des abréviations, sigles et acronymes

ACAT = Acyl-Coenzyme A-Cholestérol-Acyl-Transférase
ACNS = American Clinical Neurophysiology Society
AMPA = Acide AminoMéthylPhosphonique
AVC = Accident Vasculaire Cérébral
AUC = Area Under the Receiver Operating Characteristic Curve
BiPDs = Bilateral Independent Periodic Discharges
BHE = Barrière Hémato-Encéphalique
CV = Coefficient de Variation
EaSiBUSSEs = EEG-based seizure build-up score in status epilepticus
EEG = Électroencéphalogramme
EME = États de Mal Épileptiques
EMSE = Epidemiology-based Mortality score in Status Epilepticus
END-IT = Encephalitis, Nonconvulsive status epilepticus, Diazepam resistance, Image abnormalities and Tracheal intubation
FDA = Food and Drug Administration
FIRES = Febrile Infection-Related Epilepsy Syndrome
GABA = Acide Gamma-AminoButyrique
GFAP = Glial Fibrillary Acidic Protein
GPD = Generalized Periodic Discharges
HDL = High Density Lipoprotein
HMBD = Human Metabolome Database
HMGB1 = High Mobility Group Box 1
HMG-CoA = 3-hydroxy-3-méthylglutary-CoA
HMG-CoA reductase = 3-hydroxy-3-méthylglutary-CoA réductase
IDL = Intermediate Density Lipoprotein
IL-1 β = Interleukin 1-bêta
IL-6 = Interleukin 6
ILAE = International League Against Epilepsy
IP = Intra péritonéale
KA = Kaïnate
KEGG = Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LCAT = Lécithine Cholestérol Acyltransférase
LCR = Liquide Céphalo-Rachidien
LDL = Low Density Lipoprotein
LPD = Lateralized Periodic Discharges
LPL = Lipoprotéine Lipase
LXR = Liver X Receptors
mPTP = mitochondrial Permeability Transition Pore
mSTESS = modified Status Epilepticus Severity Score
NFH = NeuroFilament Heavy chain
NIH = National Institute of Health
NMDA = N-Methyl-D-Aspartate
NORSE = New-Onset Refractory Status Epilepticus
NOS = Nitric Oxide Synthase
NSE = Neuron Specific Enolase
PBS = Phosphate-Buffered Saline
PCA = Principal Component Analysis
PLS-DA = Partial Least Squares regression Discriminant Analysis
ROC = Receiver Operating Characteristic Curve
ROS = Reactive Oxygen Species
RXR = Retinoic X Receptors
SCAP = SREBP cleavage-activating protein
SEEIT = Status Epilepticus Etiology Identification Tool
SNC = Système Nerveux Central
SRE = Sterol Response Element
SREBP = Sterols Regulatory Element Binding Protein
STESS = Status Epilepticus Severity Score
SVM = Support Vector Machine (Machine à vecteurs de support)
TGLH = Triglycérides Lipase Hépatique
UHPLC-HRMS = Chromatographie Liquide Ultra-Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution
VILIP-1 = Visinin-like protein 1
VLDL = Very Low Density Lipoprotein

Introduction

Partie 1. Les états de mal épileptiques (EME)

Les états de mal épileptiques (EME) représentent l'une des principales urgences neurologiques. Ils peuvent survenir au cours d'une maladie épileptique connue ou être inauguraux. L'EME tonico-clonique généralisé en est la forme la plus connue et la plus impressionnante. Cependant, les EME peuvent se présenter sous d'autres formes cliniques, moins spectaculaires, comme les EME focaux moteurs ou les EME non convulsifs. La grande hétérogénéité des présentations cliniques et des pronostics nous amène à parler des états de mal épileptiques au pluriel.

1. Définitions des états de mal épileptiques

1.1. Évolution de la définition des EME

La définition des EME a évolué au cours du temps (Trinka and Kälviäinen 2017) (Figure 1). La première, proposée par Gastaut en 1962, définissait les EME comme une crise d'épilepsie qui persistait suffisamment longtemps ou qui se répétait suffisamment fréquemment pour produire une condition fixe et durable (Gastaut 1970). Cette définition ne proposait pas de durée de crise nécessaire bien que Gastaut ait suggéré une durée minimale de 60 minutes (Gastaut 1983). Les EME ont par la suite été définis comme une crise d'épilepsie se prolongeant au-delà de 30 minutes ou se répétant sur 30 minutes à des intervalles brefs sans reprise de conscience entre les crises (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy 1981). Cette nouvelle définition ne prenait pas en compte les différents types sémiologiques d'EME. Elle a été révisée, progressivement, et une définition opérationnelle réduisant le délai à 5 minutes pour l'EME tonico-clonique généralisé a été proposée en 1999 (Lowenstein et al. 1999). En 2015, la Ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE, *International League Against Epilepsy*) a proposé une nouvelle définition des EME, axée sur la durée de l'EME et sa sémiologie (Trinka et al. 2015). Cette nouvelle définition a introduit deux notions importantes : une durée T1 à partir de laquelle l'EME est défini et un traitement doit être initié, et une durée T2 avant laquelle l'EME doit être contrôlé sous réserve de séquelles à long terme (Figure 1).

Les durées T1 et T2 varient selon la sémiologie de l'EME avec respectivement pour l'EME tonico-clonique généralisé une durée T1 de 5 minutes et T2 de 30 minutes ; pour les EME focaux avec troubles de conscience une durée T1 de 10 minutes et T2 de 60 minutes et pour les EME focaux sans trouble de conscience ou l'EME absence une durée T1 de 10 à 15 minutes sans durée T2 définie (Trinka et al. 2015) (Figure 1).

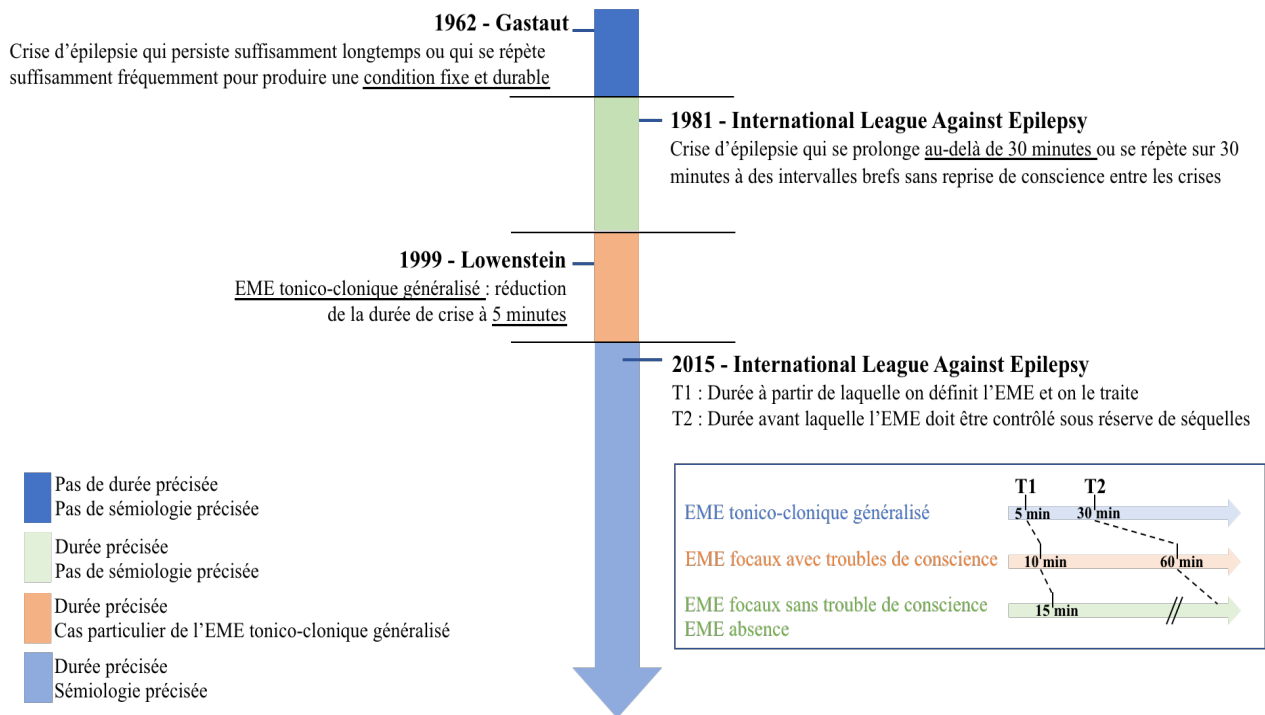


Figure 1 : Évolution des définitions des états de mal épileptiques au cours du temps.
Adapté de Trinka and Kälviäinen. *Seizure* 2017.

La durée T2 pour l'EME tonico-clonique généralisé a été fixée conformément aux précédentes définitions des EME (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy 1981; Commission on Epidemiology and Prognosis, International League Against Epilepsy 1993). Les données de la littérature chez l'Homme concernant les atteintes cérébrales secondaires à l'EME sont actuellement limitées pour les EME focaux voire nulles pour l'EME absence et les résultats obtenus par l'expérimentale animale sont très hétérogènes (Trinka et al. 2015). Par conséquent, l'ILAE n'a pas proposé de durée T2 pour les EME focaux sans trouble de conscience et l'EME absence. Par ailleurs, la durée T2 pour les EME focaux avec troubles de conscience doit être interprétée prudemment car l'atteinte cérébrale observée est probablement liée à la durée de la crise épileptique mais aussi à la localisation du foyer épileptique, l'intensité de l'EME et l'âge du patient (Trinka et al. 2015).

1.2. Les EME réfractaires, super-réfractaires, et prolongés super-réfractaires

Un groupe d'experts internationaux du *Critical Care EEG Monitoring Research Consortium* a standardisé les notions d'EME réfractaire, EME super-réfractaire, EME prolongé réfractaire et EME prolongé super-réfractaire (Hirsch et al. 2018). Ces nouvelles définitions permettent d'optimiser la communication entre professionnels et de faciliter les études multicentriques internationales.

L'EME réfractaire est défini par la persistance de l'EME clinique ou électrique malgré deux lignes thérapeutiques différentes et bien conduites de médicaments antiépileptiques, dont une benzodiazépine, administrés en parentéral, aux bonnes posologies et avec les bons délais d'action (Hirsch et al. 2018; Outin et al. 2020). Aucune durée n'est requise pour parler d'un EME réfractaire. Au sein des EME réfractaires, des entités particulièrement sévères ont été individualisées : les EME réfractaires *de novo* (NORSE, *New Onset Refractory Status Epilepticus*) et une de leurs catégories, les EME réfractaires *de novo* secondaires à la survenue d'une infection fébrile (FIRES, *Febrile infection-related epilepsy syndrome*) (Hirsch et al. 2018). Les NORSE apparaissent chez des enfants et adultes sans épilepsie préexistante, sans antécédent neurologique et sans cause structurelle, toxique ou métabolique retrouvée dans les 72 premières heures de prise en charge. Les NORSE se définissent par leur présentation clinique et ne constituent pas un diagnostic spécifique. Ils peuvent survenir au décours d'un ensemble de pathologies telles que les encéphalites virales (notamment les encéphalites herpétiques liées au virus herpès simplex de type 1, HSV-1), les encéphalopathies dysimmunes à médiation humorale ou encore les encéphalopathies mitochondriales. Les NORSE pour lesquels aucune étiologie n'est retrouvée en dépit d'explorations larges (imagerie, biologie, recherche de toxiques) sont qualifiés de NORSE « cryptogéniques ». Les FIRES peuvent survenir chez des patients de tout âge et sont précédés d'une infection fébrile qui débute entre 24 heures et deux semaines avant le début de l'EME réfractaire.

L'EME super-réfractaire est défini par la résistance à trois lignes différentes et bien conduites de médicaments antiépileptiques recommandés (Outin et al. 2020). Dans le cadre de l'EME tonico-clonique généralisé, il est établi que la troisième ligne de traitement est l'anesthésie générale. Par conséquent, l'EME tonico-clonique généralisé super-réfractaire est défini par la persistance ou la récurrence de l'EME dans les 24 heures ou plus après une anesthésie générale (Hirsch et al. 2018).

Si l'EME persiste pendant 7 jours en dépit d'une stratégie thérapeutique adaptée, il est alors qualifié d'EME prolongé réfractaire (Hirsch et al. 2018). La persistance d'un EME pendant 7 jours malgré le recours à une anesthésie générale définit l'EME prolongé super-réfractaire (Hirsch et al. 2018).

2. Épidémiologie des états de mal épileptiques

2.1. Incidence

Les EME ont une incidence difficile à estimer en raison de présentations cliniques variées. Néanmoins, l'incidence des EME estimée à partir de cohortes américaines, européennes et asiatiques serait de l'ordre de 5 à 41 nouveaux cas pour 100 000 individus par an (Betjemann and Lowenstein 2015; Lv et al. 2017; Marawar et al. 2018; Leitinger et al. 2019; Alkhachroum et al. 2020) (Figure 2). L'hétérogénéité rapportée peut être expliquée par l'évolution, au cours du temps, de la durée de crise(s) nécessaire pour parler d'un EME (de 30 minutes en 1981, à 5-15 minutes selon le type sémiologique d'EME depuis 2015). Une méta-analyse des études conduites entre 2009 et 2016, soit majoritairement avant la publication de la nouvelle définition des EME, a rapporté une incidence moyenne annuelle de 12,6 cas pour 100 000 individus par an (Lv et al. 2017). En comparaison, la première étude basée sur les critères de l'ILAE de 2015 a rapporté une incidence de 36,1 cas pour 100 000 individus par an (Leitinger et al. 2019).

Les EME réfractaires représentent 29 à 43% des EME et ont une incidence annuelle estimée entre 3 et 7,2 cas pour 100 000 individus (Kantanen et al. 2017; Marawar et al. 2018; Leitinger et al. 2019; Alkhachroum et al. 2020) (Figure 2). L'incidence annuelle des FIRES a été estimée en Allemagne chez les enfants et adolescents à respectivement 1 pour 1 000 000 et 1 pour 100 000 (Specchio and Pietrafusa 2020). Les NORSE représentent environ 20% des EME réfractaires soit 3200 cas par an aux États-Unis (Gaspard et al. 2018).

Les EME super-réfractaires ont une incidence annuelle estimée entre 0,4 et 1,2 cas pour 100 000 individus (Kantanen et al. 2017; Leitinger et al. 2019) (Figure 2).

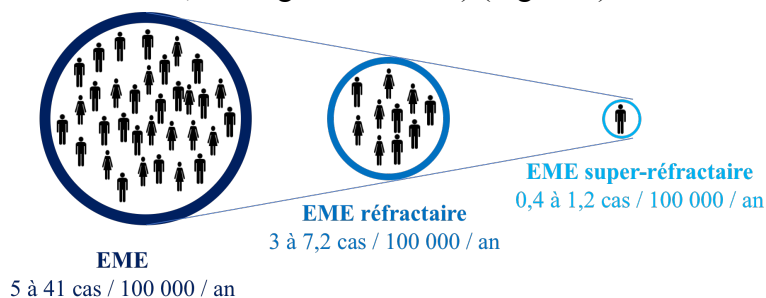


Figure 2 : Incidence des différents types d'états de mal épileptiques.

2.2. Facteurs de risque

Aucune différence dans l'incidence des EME n'a été rapportée entre les pays développés (11,7 cas pour 100 000 individus par an) et les pays en voie de développement (13,8 cas pour 100 000 individus par an) (Lv et al. 2017). En revanche, l'incidence annuelle de l'EME tonico-clonique généralisé semble différente entre les populations caucasiennes (6,94 cas pour 100 000 individus), hispaniques (3,46 cas pour 100 000 individus), asiatiques (2,65 cas pour 100 000 individus) et afro-américaines (13,35 cas pour 100 000 individus) (Wu et al. 2002).

Les études rapportent des résultats discordants quant à un impact du sexe sur la survenue des EME. Aucune influence du sexe n'a été observée dans la méta-analyse des études conduites entre 2009 et 2016 (Lv et al. 2017). En revanche, au sein d'une cohorte américaine, l'incidence annuelle de l'EME tonico-clonique généralisé était significativement plus importante chez les hommes que les femmes (6,38 cas *versus* 5,98 cas pour 100 000 individus) (Wu et al. 2002). De mêmes, les FIRES semblent prédominer chez les hommes tandis que les NORSE prédominent chez les femmes (Kramer et al. 2011; Gaspard et al. 2015).

L'âge est un facteur de risque pour la survenue d'un EME. La courbe d'incidence annuelle de l'EME tonico-clonique généralisé présente deux pics : avant 5 ans (7,5 cas pour 100 000 individus) et après 60 ans (22,3 cas pour 100 000 individus) (Wu et al. 2002). Les sujets âgés de plus de 60 ans ont environ quatre fois plus de risque de présenter un EME que les sujets jeunes (27,1 cas *versus* 7,0 cas pour 100 000 individus par an) (Lv et al. 2017; Marawar et al. 2018; Alkhachroum et al. 2020). En comparaison, les EME réfractaires surviennent plus fréquemment chez les sujets jeunes (Holtkamp et al. 2005; Alkhachroum et al. 2020).

3. Diagnostic positif des états de mal épileptiques

3.1. Nouvelle classification des EME

L'ILAE a publié en 2015 une nouvelle classification distinguant les EME selon quatre axes : la sémiologie, l'étiologie, l'âge du patient et les résultats de l'électroencéphalogramme (EEG) (Trinka et al. 2015). Cette nouvelle classification optimise le diagnostic positif des EME.

* La sémiologie

Les EME sont distingués par leur présentation clinique selon deux critères principaux : la présence ou l'absence de symptômes moteurs et le degré de conscience du patient (Tableau 1) (Trinka et al. 2015).

EME avec symptômes moteurs au premier plan	EME sans symptôme moteur au premier plan
<ul style="list-style-type: none"> • EME convulsif <ul style="list-style-type: none"> ○ Généralisé ○ Début focal secondairement généralisé ○ Début indéterminé (focal ou généralisé) • EME myoclonique <ul style="list-style-type: none"> ○ Avec coma ○ Sans coma • EME focal moteur <ul style="list-style-type: none"> ○ Crises focales motrices répétées ○ Épilepsie partielle continue ○ EME adversif ○ EME oculoclonique ○ Parésie ictale • EME tonique • EME hyperkinétique 	<ul style="list-style-type: none"> • EME non convulsif avec coma • EME non convulsif sans coma <ul style="list-style-type: none"> ○ Généralisé <ul style="list-style-type: none"> ▪ EME absence typique ▪ EME absence atypique ▪ EME absence myoclonique ○ Focal <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sans altération de la conscience ▪ EME aphasique ▪ Avec altération de la conscience ○ Caractère focal ou généralisé inconnu <ul style="list-style-type: none"> ▪ EME autonome

Tableau 1 : Classification des états de mal épileptiques selon l'axe sémiologie.
Adapté de Trinkka et al. *Epilepsia* 2015.

Le diagnostic des EME convulsifs, cliniquement typiques, repose sur l'examen clinique tandis que le diagnostic des EME non convulsifs n'est aujourd'hui pas possible sans l'EEG.

*** L'étiologie**

Les EME ont été séparés en quatre catégories selon que leurs étiologies puissent être mises en évidence ou non par les explorations cliniques et paracliniques (biologie, EEG, imageries) et par les antécédents des patients (Tableau 2) (Trinka et al. 2015).

Étiologies des EME	
<ul style="list-style-type: none"> • Cause connue = symptomatique <ul style="list-style-type: none"> ○ Aigüe (AVC, intoxication, encéphalite) ○ Séquentaire (post-traumatique, post-AVC) ○ Progressive (tumeur cérébrale, épilepsie myoclonique progressive) 	<ul style="list-style-type: none"> • Cause inconnue = cryptogénique

Tableau 2 : Classification des états de mal épileptiques selon l'axe étiologie.
Adapté de Trinkka et al. *Epilepsia* 2015.

*** L'âge**

Les EME peuvent survenir à tout âge de la vie, avec parfois un syndrome épileptique propre à des catégories d'âge (Tableau 3). Pour homogénéiser les terminologies, l'ILAE a proposé de séparer les âges en cinq catégories : nouveaux nés (de 0 à 30 jours), nourrissons (de 1 mois à 2 ans), enfants (de 2 à 12 ans), adolescents et adultes (de 12 à 59 ans) et personnes âgées (au-delà de 60 ans) (Trinka et al. 2015).

Nouveaux nés et nourrissons	EME tonique (syndrome de West) EME myoclonique (syndrome de Dravet) EME focal EME post syndrome fébrile
Enfants	EME tonique (syndrome de Lennox-Gastaut) EME non convulsif (syndrome épileptique de l'enfance)
Adolescents et adultes	EME myoclonique dans l'épilepsie myoclonique juvénile EME absence dans l'épilepsie absence juvénile EME myoclonique dans le syndrome de Down
Personnes âgées	EME myoclonique dans la maladie d'Alzheimer EME non convulsif dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob

Tableau 3 : Classification de certains états de mal épileptiques selon l'axe âge.
Adapté de Trinka et al. *Epilepsia* 2015.

*** Les résultats de l'EEG**

Aucune anomalie EEG n'est spécifique d'un type d'EME. Cependant, l'ILAE propose de décrire les anomalies EEG survenant au cours des EME selon leur localisation, leur morphologie, leur évolution au cours du temps et leur sensibilité aux stimulations et aux traitements (Trinka et al. 2015).

3.2. Critères diagnostiques consensuels des EME non convulsifs

Le diagnostic des EME non convulsifs nécessite la réalisation d'un EEG. Des critères consensuels, dits critères de Salzburg, ont été proposés en 2013 pour guider le diagnostic des EME non convulsifs sur l'EEG (Tableau 4) (Beniczky et al. 2013). Ces critères ont été évalués dans une étude rétrospective qui a démontré leur capacité à diagnostiquer efficacement les EME non convulsifs (sensibilité de 97,7% et spécificité de 89,6%) (Leitinger et al. 2016).

Patients sans encéphalopathie épileptique connue	Patients avec antécédents d'encéphalopathie épileptique
<ul style="list-style-type: none"> • Anomalies épileptiformes de fréquence > 2,5 Hz • Anomalies épileptiformes de fréquence \leq 2,5 Hz ou activités rythmiques delta/thêta de fréquence > 0,5 Hz avec : <ul style="list-style-type: none"> ○ Amélioration EEG et clinique après l'administration d'un antiépileptique par voie intraveineuse ○ Phénomènes cliniques ictaux concomitants ○ Évolution spatio-temporelle typique 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de la prévalence ou de la fréquence des anomalies en comparaison à l'état antérieur avec des changements cliniques associés • Amélioration EEG et clinique après l'administration d'un antiépileptique par voie intraveineuse

Tableau 4 : Critères de Salzburg : diagnostic des états de mal épileptiques non convulsifs.
Adapté de Beniczky et al. *Epilepsia* 2013.

Les critères de Salzburg ont été précisés, en 2015, conformément aux recommandations de la Société Américaine de Neurophysiologie Clinique (ACNS, *American Clinical Neurophysiology Society*) : les anomalies épileptiformes de fréquence supérieure à 2,5 Hz doivent être présentes pendant au minimum 10 secondes continues (Leitinger et al. 2015a).

L'ACNS a défini dans sa nouvelle nomenclature, en 2021, les modalités diagnostiques des EME électriques en se basant sur les critères de Salzburg (Hirsch et al. 2021). Un EME électrique se définit par la présence d'une crise d'épilepsie d'une durée supérieure à 10 minutes continues ou par la répétition de crises dont la durée cumulée dépasse les 20% d'un enregistrement EEG d'une heure (12 minutes). Ce seuil a été choisi conformément à une étude rapportant une atteinte neurologique significativement plus importante chez des enfants présentant des crises sur plus de 20% du tracé EEG (Payne et al. 2014).

4. Diagnostic étiologique des états de mal épileptiques

4.1. Les principales étiologies

Environ la moitié des EME surviennent chez des patients ayant un antécédent d'épilepsie tandis que l'autre moitié des EME sont inauguraux et dits « *de novo* ». Il existe une multitude d'étiologies pour les EME, regroupées depuis 2015 en quatre catégories (aigüe, séquellaire, progressive ou cryptogénique), selon les recommandations de l'ILAE (Tableau 5) (Pichler and Hocker 2017).

Causes aiguës	<ul style="list-style-type: none"> • AVC ischémique ou hémorragique • Anomalies métaboliques <ul style="list-style-type: none"> ○ Troubles hydroélectrolytiques ○ Hypoglycémie ○ Urémie ○ Insuffisance hépatique fulminante • Sepsis • Traumatisme crânien aigu • Causes médicamenteuses ou toxiques <ul style="list-style-type: none"> ○ Toxicité aiguë médicamenteuse ○ Sevrage de l'alcool ou d'une benzodiazépine ○ Inobservance des antiépileptiques • Infection du système nerveux central ou infection systémique • Encéphalopathie hypertensive • Encéphalopathie auto-immune
Causes séquellaires	<ul style="list-style-type: none"> • Séquelle d'un traumatisme crânien • Séquelle d'une maladie cérébrovasculaire • Séquelle de neurochirurgie
Causes progressives	<ul style="list-style-type: none"> • Tumeur cérébrale • Syndromes épileptiques évolutifs (épilepsie myoclonique progressive) • Troubles neurodégénératifs

Tableau 5 : Exemples d'étiologies d'état de mal épileptique de cause connue réparties selon les catégories de l'ILAE.

Adapté selon Pichler et Hocker. *Handbook of Clinical Neurology* 2017.

Les étiologies les plus fréquemment retrouvées chez les patients ayant un antécédent d'épilepsie sont en lien avec leur traitement (non-observance, iatrogénie médicamenteuse), un sevrage en alcool ou en benzodiazépines, ou encore une maladie cérébrovasculaire (Tableau 6) (Outin et al. 2020). Chez les patients sans antécédent d'épilepsie, les EME sont majoritairement provoqués par une maladie cérébrovasculaire, une exposition toxique volontaire ou accidentelle ou une tumeur cérébrale (Tableau 6) (Outin et al. 2020).

Étiologies	Antécédents d'épilepsie	EME <i>de novo</i>
Lien avec les traitements (inobservance, iatrogénie)	16-35%	-
Sevrage en alcool ou en benzodiazépines	5-20%	6-10%
Tumeur cérébrale	14%	3-18%
Maladie cérébrovasculaire (séquelle ou aigüe)	8-14%	32%
Traumatisme crânien (séquelle ou aigu)	5%	7%
Encéphalopathie toxique ou métabolique	4-15%	5-20%
Infection hors du système nerveux central	5-7%	2%
Infection du système nerveux central	3%	5-9%
Maladie inflammatoire	-	6%
Maladie neurodégénérative	-	2%
Épilepsie connue sans facteur provoquant	15%	-
Origine inconnue	-	5-10%

Tableau 6 : Étiologies les plus fréquentes des états de mal épileptiques.

Adapté des recommandations pour la prise en charge des états de mal épileptiques. *SRLF* 2018.

4.2. Modalités diagnostiques

La cause de l'EME doit être identifiée et traitée, si elle est curable, le plus tôt possible pour faciliter le contrôle de l'EME et améliorer le pronostic du patient. Dans cette optique, un algorithme décisionnel (SEEIT, *Status Epilepticus Etiology Identification Tool*) a été proposé pour guider le bilan étiologique de l'EME (Alvarez et al. 2014) (Figure 3).

Cet algorithme repose sur les résultats de l'anamnèse, l'existence ou non d'antécédents d'épilepsie, le caractère focal ou généralisé des crises, l'examen clinique complet, l'examen biologique (glycémie, natrémie, calcémie ionisée ou totale, magnésémie, formule sanguine, marqueurs de l'inflammation [protéine C-réactive CRP, procalcitonine], dosage des antiépileptiques si concerné), l'EEG, l'imagerie et éventuellement la ponction lombaire.

L'imagerie peut être retardée ou non réalisée si le patient est revenu à son état clinique antérieur, si la cause de l'EME ne fait aucun doute ou que les données d'imagerie n'ont aucune incidence sur la stratégie thérapeutique (Outin et al. 2020).

La ponction lombaire doit être réalisée, en urgence, après l'imagerie et en l'absence de contre-indication chez tous les patients suspects d'infection du système nerveux central (SNC) ou immunodéprimés. Elle doit être répétée en cas de suspicion d'encéphalite, de pléiocytose isolée modérée (moins de 25 éléments par microlitre) ou pour rechercher une étiologie dysimmunitaire (recherche d'auto-anticorps, de virus, de bactéries) (Outin et al. 2020).

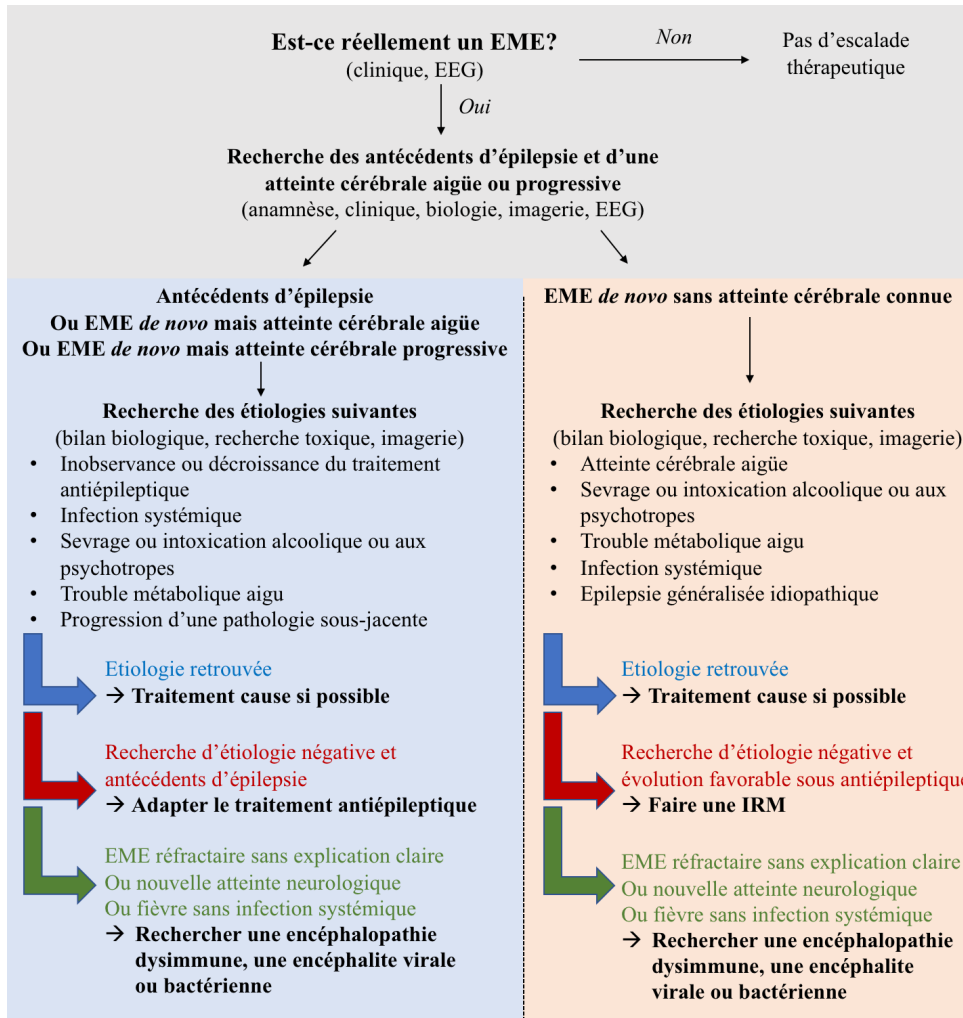


Figure 3 : Algorithme pour le diagnostic étiologique des états de mal épileptiques. Adapté d'Alvarez et al. *Epilepsia* 2014.

5. Prise en charge thérapeutique des états de mal épileptiques

5.1. Prise en charge spécifique des EME

La prise en charge thérapeutique, rapide et adaptée, des EME est nécessaire pour limiter le risque de persistance des crises et les séquelles associées.

* Traitement de première ligne de l'EME tonico-clonique généralisé

La prise en charge de l'EME tonico-clonique généralisé repose, en première ligne, sur l'administration d'une benzodiazépine par voie intraveineuse (lorazépam, clonazépam ou diazépam) ; ou par voies intramusculaire (midazolam), buccale (midazolam) ou rectale (diazépam) lorsqu'une administration par voie intraveineuse n'est pas possible (Trinka and Kälviäinen 2017).

L'administration de benzodiazépines permet de contrôler près de 60% des EME généralisés (Trinka and Kälviäinen 2017). L'efficacité des benzodiazépines dans la prise en charge préhospitalière des adultes présentant un EME convulsif a été mise en évidence, pour la première fois au début des années 2000, dans une étude randomisée conduite en double aveugle contre placebo (Alldredge et al. 2001). Dans cette étude, près de 60% des patients ayant reçu le lorazépam et 43% des patients ayant reçu le diazépam présentaient un arrêt de l'EME lors de leur admission au service des urgences contre seulement 21% des patients ayant reçu le placebo (Alldredge et al. 2001). Les complications respiratoires et cardiovasculaires étaient par ailleurs deux fois plus fréquentes dans le groupe placebo (22,5% contre 10,6% pour le lorazépam et 10,3% pour le diazépam) (Alldredge et al. 2001). Cette étude a démontré à la fois l'efficacité et la bonne tolérance des benzodiazépines et mis en évidence une supériorité du lorazépam par rapport au diazépam pour l'arrêt de l'EME chez l'adulte (Alldredge et al. 2001). Des résultats similaires ont été observés dans l'EME convulsif chez l'enfant. Une dose unique de lorazépam a permis un arrêt des convulsions chez 76% des enfants tandis qu'une dose unique de diazépam n'a pu arrêter les convulsions que chez 51% des enfants (Appleton et al. 1995). De plus, le lorazépam a montré un meilleur profil de tolérance ; seulement 3% des enfants traités par le lorazépam ont présenté une détresse respiratoire contre 15% des enfants traités par le diazépam (Appleton et al. 1995). La supériorité du lorazépam, en comparaison au diazépam, pour l'arrêt des crises, a été confirmée par une méta-analyse réalisée par le *Cochrane Epilepsy Group's Specialized Register* (Prasad et al. 2014). Une étude randomisée, conduite en double aveugle par le *Veterans Affairs Status Epilepticus Cooperative Study Group*, a également démontré la supériorité du lorazépam par rapport à la phénytoïne pour la prise en charge initiale de l'EME généralisé de l'adulte (64,9% des patients traités par le lorazépam présentaient un contrôle de l'EME contre 43,6% des patients traités par la phénytoïne) (Treiman et al. 1998). Cette étude a par ailleurs et surtout mis en évidence que la précocité du traitement était plus importante que le médicament antiépileptique choisi (Treiman et al. 1998). Cela peut expliquer qu'une autre méta-analyse ait conclu à une absence de différence d'efficacité et de tolérance entre le lorazépam et le diazépam (Brigo et al. 2016). Le clonazépam dispose d'un niveau de preuve plus faible que le lorazépam. Toutefois, une étude rétrospective multicentrique a rapporté un risque d'EME réfractaire six fois moins élevé en cas d'utilisation du clonazépam, en comparaison au lorazépam. Toutefois, ces résultats pourraient être liés à un sous-dosage du lorazépam (Alvarez et al. 2015).

En France, le lorazépam ne dispose pas d'une autorisation de mise sur le marché pour la prise en charge de l'EME. C'est pourquoi, les experts de la Société de Réanimation de Langue Française et de la Société Française de Médecine d'Urgence recommandent d'utiliser le clonazépam par voie intraveineuse (0,015 mg/kg) (Figure 4) (Outin et al. 2020).

En l'absence de voie intraveineuse disponible rapidement, il est recommandé de recourir, chez l'adulte, au midazolam par voie intramusculaire (0,15 mg/kg) et, chez l'enfant, au diazépam par voie rectale (0,5 mg/kg) ou au midazolam par voie buccale (0,3 mg/kg) (Outin et al. 2020). Une méta-analyse des études conduites entre 1950 et 2009 a conclu à une supériorité du midazolam par rapport au diazépam pour l'arrêt des crises et à une tolérance similaire, et ce quelle que soit la voie d'administration utilisée (McMullan et al. 2010). Le midazolam est intéressant pour son faible délai d'action, inférieur à 1 minute, et pour la possibilité de l'administrer par plusieurs voies (Outin et al. 2020).

Il est conseillé de répéter l'injection de la benzodiazépine en cas de persistance clinique de l'EME tonico-clonique généralisé 5 minutes après la première injection (Figure 4). La seconde injection d'une benzodiazépine augmente le risque de dépression respiratoire et doit donc être effectuée avec prudence chez les patients ayant présenté des signes de défaillance respiratoire après la première dose et chez les patients âgés (Outin et al. 2020).

*** Traitement de deuxième ligne de l'EME tonico-clonique généralisé**

Si l'EME tonico-clonique généralisé persiste 5 minutes après la seconde injection de benzodiazépines, il faut alors administrer par voie intraveineuse un antiépileptique de deuxième ligne. Quatre traitements antiépileptiques peuvent être administrés : le valproate de sodium (40 mg/kg), la fosphénytoïne ou la phénytoïne (20 mg/kg), le lévétiracétam (30 à 60 mg/kg) et le phénobarbital (15 mg/kg) (Figure 4) (Trinka and Kälviäinen 2017; Outin et al. 2020). Le choix du traitement est conditionné par le terrain du patient (âge, sexe, antécédents de troubles du rythme et de la conduction), les éventuels traitements antiépileptiques antérieurs, l'étiologie de l'EME et les habitudes des prescripteurs (Figure 4).

Le valproate de sodium est à éviter chez les femmes en âge de procréer et à utiliser avec précaution en cas d'insuffisance hépatique. Il ne doit pas être utilisé en cas de pathologie mitochondriale. La fosphénytoïne est contre-indiquée en cas de troubles du rythme ou de la conduction ainsi que chez les patients souffrant d'une épilepsie généralisée idiopathique.

Le lévétiracétam présente un excellent profil de tolérance et n'entraîne pas d'effet indésirable grave. En revanche, son niveau de preuve est encore insuffisant pour le recommander en première intention. Le phénobarbital présente le plus d'effets indésirables (hypotension, dépression ventilatoire) et nécessite donc une surveillance rapprochée. Il n'est par conséquent pas recommandé en première intention.

Une étude rétrospective, non randomisée, conduite chez 279 patients adultes ayant présenté un EME résistant aux benzodiazépines, a mis en évidence que le valproate de sodium permettait un arrêt de l'EME plus fréquemment que le lévétiracétam ; respectivement dans 59,6% des cas contre 51,7% des cas (odds ratio 2,69) (Alvarez et al. 2011). Une méta-analyse de 22 études a conclu à une efficacité plus importante du lévétiracétam (68,5%) et du valproate de sodium (75,7%) par rapport à la phénytoïne (50,2%) pour le contrôle des EME convulsifs résistants aux benzodiazépines (Yasiry and Shorvon 2014). L'étude ESETT (*Established Status Epilepticus Treatment Trial*) est la première étude prospective, à avoir comparé l'efficacité et la tolérance de trois médicaments antiépileptiques de deuxième ligne (lévétiracétam, fosphénytoïne et valproate de sodium) chez des patients présentant un EME convulsif résistant aux benzodiazépines (Kapur et al. 2019). Pour cette étude multicentrique, randomisée et en double aveugle, 384 patients âgés de plus de 2 ans ont été inclus entre novembre 2015 et octobre 2017. Cette étude n'a pas mis en évidence de différence d'efficacité entre ces trois traitements : 47% des patients traités par le lévétiracétam ont présenté un arrêt des convulsions et une amélioration du niveau de conscience après 60 minutes, contre 45% des patients traités par la fosphénytoïne et 46% des patients traités par le valproate de sodium (Kapur et al. 2019). Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les effets indésirables (hypotension, arythmie cardiaque) ou la nécessité de recourir à une intubation orotrachéale (Kapur et al. 2019). Une seconde étude a été conduite sur cette cohorte de patients pour évaluer l'impact de l'âge du patient sur l'efficacité et la tolérance de ces trois médicaments (Chamberlain et al. 2020). Le recrutement des patients s'est prolongé jusqu'en décembre 2018 ; 462 patients ont été inclus et répartis en trois classes d'âge : 225 patients âgés de moins de 18 ans, 186 patients âgés de 18 à 65 ans et 51 patients âgés de plus de 65 ans. Cette étude n'a pas mis en évidence de différence d'efficacité ou de tolérance selon l'âge des patients et le médicament utilisé : (i) lévétiracétam : 52% d'efficacité chez les moins de 18 ans, 44% chez les 18-65 ans et 37% chez les plus de 65 ans ; (ii) fosphénytoïne : 49% d'efficacité chez les moins de 18 ans, 46% chez les 18-65 ans et 35% chez les plus de 65 ans et (iii) valproate de sodium : 52% d'efficacité chez les moins de 18 ans, 46% chez les 18-65 ans et 47% chez les plus de 65 ans (Chamberlain et al. 2020).

Deux études récentes ont évalué l'intérêt d'associer d'emblée un traitement antiépileptique de deuxième ligne à une benzodiazépine pour favoriser le contrôle de l'EME.

Une première étude, randomisée, de phase 3, conduite en double aveugle contre placebo, à évaluer l'intérêt d'associer d'emblée le lévétiracétam au clonazépam pour la prise en charge de l'EME généralisé (Navarro et al. 2016). Cette étude n'a pas mis en évidence de bénéfice à ajouter le lévétiracétam au clonazépam, les convulsions ayant cessé chez 84% des patients ayant reçu le clonazépam et le placebo contre 74% des patients ayant reçu le clonazépam et le lévétiracétam (Navarro et al. 2016).

Une seconde étude randomisée a évalué l'intérêt d'associer la phénytoïne, le valproate de sodium ou le lévétiracétam au lorazépam pour la prise en charge de l'EME généralisé. Cette étude n'a pas non plus retrouvé de différence significative entre les groupes (Mundlamuri et al. 2015).

*** Traitement de troisième ligne de l'EME tonico-clonique généralisé**

Si les convulsions persistent 30 minutes après le début de l'administration du traitement de deuxième ligne, il faut alors recourir à un coma thérapeutique au moyen d'un agent anesthésique administré par voie intraveineuse. Différents agents anesthésiques peuvent être utilisés : le midazolam (5 mg en bolus intraveineux, répété jusqu'à la disparition des crises et suivi d'une perfusion de 0,2 à 0,5 mg/kg/h), le propofol (1 à 2 mg/kg en bolus intraveineux, répété jusqu'à la disparition des crises et suivi d'une perfusion de 3 à 4 mg/kg/h), ou le thiopental (1,5 à 2,5 mg/kg en bolus intraveineux, puis bolus de 50 mg toutes les 2 à 3 minutes jusqu'à la disparition des crises, suivi d'une perfusion de 2 à 5 mg/kg/h) (Outin et al. 2020). Le thiopental présente le plus d'effets indésirables et induit une sédation prolongée. Il n'est par conséquent par recommandé en première intention. Il est recommandé d'obtenir une suppression des crises ou une activité « burst-suppression » à l'EEG pendant au moins 24 heures avant d'envisager une réduction progressive des agents anesthésiques généraux.

*** Traitement des autres formes d'EME**

Aucune étude contrôlée randomisée ne s'est intéressée à la prise en charge thérapeutique des autres EME. Cependant, les benzodiazépines sont probablement à privilégier en première intention. Divers antiépileptiques peuvent être utilisés en deuxième ligne, par voie intraveineuse, par voie orale ou par la sonde nasogastrique. L'instauration du traitement de deuxième ligne doit se faire avec le conseil d'un neurologue et ne revêt pas de caractère d'urgence contrairement à l'EME tonico-clonique généralisé (Outin et al. 2020).

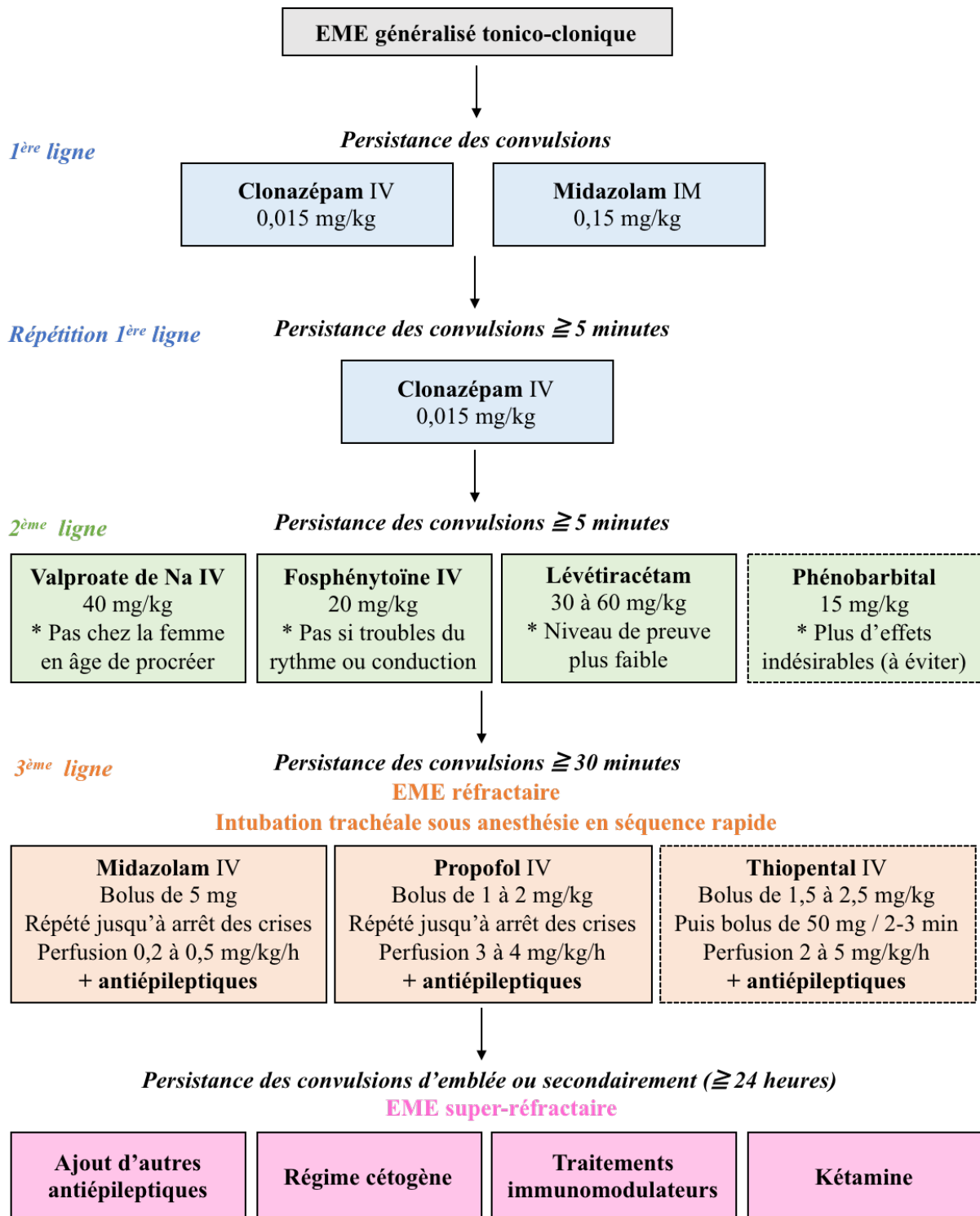


Figure 4 : Schéma de prise en charge de l'état de mal épileptique tonico-clonique généralisé chez l'adulte.

Adapté des recommandations pour la prise en charge des états de mal épileptiques. SRLF 2018.

IV = voie intraveineuse ; IM = voie intramusculaire

5.2. Prise en charge thérapeutique des EME super-réfractaires

En cas d'échec du traitement de troisième ligne, il est possible de recourir à la kétamine (1 à 3 mg/kg en bolus intraveineux suivi d'une perfusion de 0,5 mg/kg/h) couplée à un traitement antiépileptique de fond, une benzodiazépine et/ou à d'autres agents anesthésiques. En cas de nouvel échec, il faut discuter le recours à d'autres thérapeutiques : ajout de nouveaux traitements antiépileptiques, traitements immunomodulateurs ou régime cétogène (Figure 4).

*** Nouveaux traitements antiépileptiques**

Parmi les médicaments antiépileptiques de quatrième génération, le pérampanel et le brivaracétam ont été proposés pour le traitement des EME réfractaires et super-réfractaires.

Une première étude rétrospective a conclu à une efficacité du pérampanel pour 16% des patients (2 patients sur 12) présentant un EME réfractaire, avec une dose médiane initiale quotidienne de 4 mg (Rohracher et al. 2015). D'autres études ont par la suite confirmé l'intérêt du pérampanel pour la prise en charge des EME réfractaires et super-réfractaires avec un pourcentage de répondeurs évalué entre 17 et 41,3% (Rohracher et al. 2018; Ho et al. 2019; Alsherbini et al. 2020; Lim et al. 2021). Une étude rétrospective européenne a rapporté que sur 1319 patients pris en charge pour un EME, entre 2011 et 2015, 52 patients (3,9%) avaient reçu du pérampanel à une dose médiane initiale de 6 mg par jour. Le pérampanel a permis un arrêt de l'EME pour 19 patients (36,5%) (Strzelczyk et al. 2019). Aucune étude prospective, conduite contre placebo, n'a été réalisée pour confirmer l'efficacité du pérampanel.

Cinq études non contrôlées ont suggéré un intérêt du brivaracétam, en association, pour la prise en charge des EME réfractaires et super-réfractaires (Strzelczyk et al. 2017, 2018; Kalss et al. 2018; Aicua-Rapun et al. 2019; Santamarina et al. 2019). Une méta-analyse de ces cinq études a conclu à une bonne tolérance et à une efficacité du brivaracétam pour 48% des patients (37 patients sur 77), avec une réponse obtenue en moyenne quelques heures après l'administration par voie intraveineuse (Moalong et al. 2020). D'autres études prospectives sont nécessaires pour confirmer l'efficacité et la tolérance du brivaracétam.

*** Traitements immunomodulateurs/immunosuppresseurs**

Les mécanismes responsables du développement des EME réfractaires, et particulièrement des NORSE et FIRES, sont mal connus à ce jour. Cependant, de nombreux arguments suggèrent un dysfonctionnement de l'immunité, aussi ces patients sont empiriquement traités par immunothérapie, avec une efficacité cependant variable (Tan et al. 2021).

Un traitement par immunomodulateurs/immunosuppresseurs doit être considéré rapidement en cas d'encéphalite dysimmune avérée ou en cas d'EME super-réfractaire *de novo* sans cause apparente. L'instauration rapide d'une immunothérapie peut permettre d'éviter une progression de l'atrophie cérébrale et favorise dès lors un pronostic favorable (Marawar et al. 2018). Il existe différentes immunothérapies réparties en deux grandes lignes thérapeutiques : (i) corticoïdes, immunoglobulines en intraveineux et échanges plasmatiques et (ii) rituximab, cyclophosphamide et azathioprine (Gaspard et al. 2018; Marawar et al. 2018). Aucune étude prospective randomisée n'a été conduite pour conclure à la supériorité d'un traitement par rapport à un autre et les modalités d'utilisation des traitements (doses, fréquences d'administration) reposent sur des avis d'experts et non sur des recommandations officielles (Gaspard et al. 2018; Marawar et al. 2018) (Tableau 7).

Traitements	Modalités d'utilisation
Corticoïdes	Méthylprednisolone IV 1 g/jour pendant 5 jours, suivi d'une administration orale de prednisone à 1 mg/kg/jour
Immunoglobulines IV	0,4 g/kg/jour pendant 3 à 5 jours
Échanges plasmatiques	5 sessions d'échanges plasmatiques, réalisées un jour sur deux
Rituximab	375 mg/m ² chaque semaine, pendant 4 semaines
Cyclophosphamide	750 mg/m ² chaque mois
Azathioprine	1 à 3 mg/kg/jour

Tableau 7 : Modalités d'utilisation de l'immunothérapie dans l'état de mal épileptique. Adapté de Marawar et al. *Critical Care Research and Practice* 2018 & Gaspard et al. *Epilepsia* 2018.

* Régime cétogène

Un régime cétogène est caractérisé par une forte teneur en lipides et une faible teneur en glucides. En l'absence de glucides, l'organisme couvre ses besoins énergétiques grâce aux lipides. La dégradation des graisses aboutit à une libération de corps cétoniques dans le sang. Quand leur concentration est élevée, on parle de cétose. Le régime cétogène a des propriétés anti-convulsivantes et anti-inflammatoires (Gaspard et al. 2018; Marawar et al. 2018). Il entraîne, chez l'animal, une moindre libération de cytokines pro-inflammatoires (Ruskin et al. 2009). Le régime cétogène est un traitement efficace établi pour la prise en charge de l'épilepsie pharmacorésistante chez l'enfant. Par ailleurs, une étude rétrospective a montré que le régime cétogène permettait un contrôle de l'EME super-réfractaire pour 56,3% des patients (9 patients sur 16) tandis que 37,5% (6 patients sur 16) présentaient une réduction des crises de plus de 50% (Park et al. 2019). Le régime cétogène a également été montré efficace chez 7 enfants sur 9 présentant un FIRES (Nabbout et al. 2010).

6. Évaluation pronostique des états de mal épileptiques

L'identification de biomarqueurs pronostiques adaptés pour tout patient en EME est difficile de par l'hétérogénéité des présentations cliniques et des étiologies (Alkhachroum et al. 2020). Cependant, plusieurs biomarqueurs ont été suggérés ces dernières années pour prédire le risque de décès ou de dégradation des capacités fonctionnelles dans les suites d'un EME.

6.1. Les facteurs de risque de mortalité et de morbidité

Les EME sont l'une des principales urgences neurologiques et sont associés à une importance mortalité, rapportée entre 5 et 46% selon les études (Leitinger et al. 2019; Alkhachroum et al. 2020). La persistance des crises expose, par ailleurs, les patients au risque d'excitotoxicité et de mort neuronale, à l'origine de séquelles neurocognitives et motrices dont la récupération à distance de l'EME est incertaine (Kantanen et al. 2017). Si l'étiologie de l'EME semble être l'un des principaux facteurs pour prédire le risque de décès, d'autres facteurs pronostiques ont été mis en évidence (Rossetti et al. 2013).

*** Biomarqueurs démographiques**

Des résultats hétérogènes ont été rapportés concernant l'impact du sexe sur le risque de mortalité (Alkhachroum et al. 2020). Une étude récente a mis en évidence un risque de mortalité plus important chez les femmes (21,8%) que chez les hommes (9,3%) (Leitinger et al. 2019). En revanche, une autre étude a rapporté un risque de mortalité similaire spécifiquement pour l'EME tonico-clonique généralisé : 11,6% pour les femmes et 9,9% pour les hommes (Wu et al. 2002).

L'âge est un facteur important pour prédire le pronostic d'un patient présentant un EME. Les patients âgés de plus de 60 ans ont un risque accru de présenter un EME mais également de décéder des suites de l'EME : 28,4% contre 4,1% pour les moins de 60 ans (Leitinger et al. 2019). De même, près de 20% des patients âgés de plus de 75 ans vont décéder des suites d'un EME tonico-clonique généralisé contre 2,4% des patients âgés de 5 à 19 ans (Wu et al. 2002). L'âge élevé est également un facteur de risque de dégradation des capacités fonctionnelles à la suite d'un EME. Une étude rétrospective a mis en évidence que plus de la moitié des patients, admis pour un EME, présentaient une dégradation de leurs capacités fonctionnelles et une dépendance pour les actes de la vie quotidienne à leur sortie d'hospitalisation (Kang et al. 2016). Ces patients étaient significativement plus âgés que les patients avec un bon pronostic fonctionnel (en moyenne 67 ans contre 54 ans) (Kang et al. 2016).

*** Biomarqueurs étiologiques**

Une étude conduite chez 255 patients a mis en évidence que l'étiologie de l'EME pouvait expliquer près de 80% des décès observés dans les suites d'un EME (Rossetti et al. 2013).

Les patients présentant un EME d'étiologie aigüe présentent un risque accru de décès en comparaison aux patients présentant un EME de cause séquellaire ou de cause progressive (Lv et al. 2017). Les antécédents d'épilepsie semblent être un facteur protecteur contre le risque de décès (Rossetti et al. 2008). Les EME sur inobservance médicamenteuse ou intoxication alcoolique présentent un bon pronostic, avec moins de 10% de décès. Ce n'est pas le cas des EME post-anoxiques, ou des EME secondaires à une infection cérébrale ou à un accident vasculaire cérébral (AVC), pour lesquels on retrouve respectivement 65%, 32% et 26% de décès (Wu et al. 2002).

*** Biomarqueurs cliniques**

Les troubles de conscience avant traitement sont un facteur de risque indépendant de mortalité. Dans une étude rétrospective multicentrique, les patients confus ou comateux représentaient 87,5% des patients décédés des suites de l'EME contre 48,1% des patients qui ont survécu (Kang et al. 2016). Une étude rétrospective récente a rapporté que 33% des patients présentant des troubles de conscience sont décédés des suites de l'EME, contre 8,2% des patients sans trouble de conscience (Leitinger et al. 2019). Dans la même étude, parmi les 76 patients qui ont présenté un EME non convulsif, 21 patients sont décédés dont 16 présentaient des troubles de conscience (Leitinger et al. 2019). Les troubles de conscience impactent également le pronostic des EME avec symptômes moteurs : 15 patients en sont décédés dont 12 présentaient des troubles de conscience (Leitinger et al. 2019).

La sémiologie des crises et de l'EME impactent également le pronostic. Un risque accru de mortalité a été rapporté dans une cohorte rétrospective pour l'EME tonico-clonique généralisé et pour les EME non convulsifs (odds ratio 5,80) (Rossetti et al. 2008). Des résultats similaires ont été rapportés dans une seconde étude rétrospective, où 3,8% des patients ayant présenté un EME focal sont décédés, contre 17,1% des patients ayant présenté un EME tonico-clonique généralisé et 31% des patients ayant présenté un EME non convulsif avec coma (Sutter et al. 2013a). Une étude récente a confirmé la surmortalité associée aux EME non convulsifs avec coma (42,9%) mais elle a mis en évidence un pourcentage de décès plus élevé pour les EME focaux moteurs (13,7%) que pour l'EME tonico-clonique généralisé (8,5%) (Leitinger et al. 2019), probablement du fait des étiologies sous-jacentes.

* Biomarqueurs électroencéphalographiques

Il n'y a pas de consensus concernant l'impact des anomalies observées à l'EEG sur l'atteinte neuronale et le pronostic associés aux EME. Cependant, de nombreuses études ont évalué leur impact sur la mortalité et le pronostic fonctionnel.

Les anomalies périodiques sont associées aux pronostics les plus défavorables avec un niveau de risque variable selon leur localisation, leur étiologie et d'autres caractéristiques cliniques telles que l'âge, les comorbidités, ou les antécédents d'EME (Snodgrass et al. 1989; Carrera et al. 2008; Li et al. 2017). Les anomalies périodiques latéralisées (LPDs, *Lateralized Periodic Discharges*) sont fréquemment observées en cas d'AVC, d'infections du SNC ou encore de tumeurs (Johnson and Kaplan 2017). Les patients présentant des LPDs décèdent dans 5 à 50% des cas et 30 à 64% d'entre eux ont un pronostic fonctionnel défavorable (Snodgrass et al. 1989; Jaitly et al. 1997; Carrera et al. 2008; Orta et al. 2009; Sainju et al. 2015; Li et al. 2017). Les anomalies périodiques généralisées (GPDs, *Generalized Periodic Discharges*) ou bilatérales (BiPDs, *Bilateral Independent Periodic Discharges*) sont fréquemment retrouvées dans les EME post-anoxiques (Johnson and Kaplan 2017). Les patients avec GPDs ont un fort risque de décès (de 27 à 85%) et plus de la moitié d'entre eux deviennent dépendants pour les actes de la vie quotidienne (Carrera et al. 2008; Orta et al. 2009; Foreman et al. 2012; Ribeiro et al. 2015; Li et al. 2017; Beretta et al. 2018). Des résultats similaires ont été observés pour les BiPDs avec 25 à 75% de décès et un pronostic défavorable pour 39 à 75% des patients (Snodgrass et al. 1989; Carrera et al. 2008; Orta et al. 2009; Ribeiro et al. 2015; Li et al. 2017).

Des anomalies épileptiformes intercritiques (pointes, pointe-ondes) ont été retrouvées à l'EEG, dans les 24 premières heures suivant l'admission pour EME, chez 16% des patients d'une cohorte (28 patients sur 180) (Jaitly et al. 1997). Parmi ces 28 patients, 5 sont décédés et 8 ont présenté un pronostic défavorable à la sortie d'hospitalisation (Jaitly et al. 1997).

La survenue de crises d'épilepsie est rapportée chez 13 à 59% des patients admis en réanimation (Claassen et al. 2004, 2007; Shafi et al. 2012; Westover et al. 2015). Une étude rétrospective a retrouvé une récurrence de crise chez 53% des patients (96 patients sur 180) admis pour un EME, dans les 24 premières heures suivant le contrôle des manifestations cliniques (Jaitly et al. 1997). Parmi ces 96 patients, 39 sont décédés et 51 ont présenté un pronostic défavorable en sortie d'hospitalisation (Jaitly et al. 1997). Néanmoins, au-delà de l'émergence de crises, c'est surtout le pourcentage de temps de l'enregistrement EEG montrant des crises qui semble impacter le pronostic des patients. Une étude conduite chez 259 enfants a mis en évidence un seuil de 20%, au-delà duquel l'atteinte neurologique est particulièrement sévère et le pronostic défavorable (Payne et al. 2014).

6.2. Scores pronostiques : STESS, mSTESS, EMSE et END-IT

Quatre échelles pronostiques composites ont été proposées ces quinze dernières années pour prédire le risque de mortalité et de dégradation des capacités fonctionnelles, à court terme, dans les suites d'un EME.

* STESS, *Status Epilepticus Severity Score*

Ce premier outil composite clinique a été développé pour prédire le risque de décès, à court terme, pour un patient présentant un EME (Rossetti et al. 2006). Le calcul du STESS repose sur quatre variables obtenues en pré-hospitalier : l'état de conscience du patient avant traitement, le type de crises d'épilepsie, l'âge du patient et la présence ou l'absence d'antécédents d'épilepsie (Tableau 8).

	Etat de conscience avant traitement		Type de crises d'épilepsie			Âge du patient		Antécédents d'épilepsie		Total
	Alerte Somnolent Confus	Stuporeux Comateux	Crises focales	Crises généralisées tonico-cloniques	EME non convulsif	< 65 ans	≥ 65 ans	Oui	Non	
Score	0	1	0	1	2	0	2	0	1	0 à 6

Tableau 8 : STESS, *Status Epilepticus Severity Score*.

Adapté de Rossetti et al. *Neurology* 2006.

Le STESS possède une puissance limitée pour prédire le risque de décès. Uniquement 25 à 39% des patients présentant un score de STESS supérieur à 3 (seuil défini par l'étude initiale) sont décédés à la suite de l'EME (Rossetti et al. 2006, 2008; Leitinger et al. 2015b; Giovannini et al. 2017). Les performances semblent légèrement meilleures en utilisant un seuil à 4 qui permet de conclure au décès à juste titre pour 22 à 46% des patients (Sutter et al. 2013b; Leitinger et al. 2015b; Kang et al. 2016; Pacha et al. 2016; Giovannini et al. 2017). Cependant, en raison de résultats hétérogènes, il n'est pas possible d'utiliser le STESS comme un outil décisionnel pour décider d'une limitation ou d'un arrêt des thérapeutiques actives. Cet outil présente, en revanche, une bonne capacité à identifier les patients à bon pronostic et est capable de prédire la survie pour 81 à 97% des patients (Rossetti et al. 2008; Sutter et al. 2013b; Kang et al. 2016; Pacha et al. 2016). Un score de STESS supérieur à 3 semble associé à un pronostic fonctionnel défavorable trois mois après la sortie d'hospitalisation pour EME réfractaire (Madžar et al. 2016). En revanche, le STESS ne prédit le risque de présenter un pronostic fonctionnel altéré en sortie d'hospitalisation qu'avec une puissance limitée (AUC, *Area Under the Receiver Operating Characteristic Curve*, de 0,61) (Kang et al. 2016).

Simple d'utilisation et facilement applicable pour tous les patients en EME, ce premier outil présente toutefois des limites importantes : (i) le score repose sur des données obtenues en pré-hospitalier, avant l'instauration d'un traitement antiépileptique, et ne peut par conséquent pas être répété au cours de la prise en charge, (ii) il présente une puissance limitée et hétérogène pour prédire le risque de décès et (iii) il n'est pas capable de prédire efficacement le risque de dégradation des capacités fonctionnelles dans les suites d'un EME.

*** mSTESS, modified *Status Epilepticus Severity Score***

Ce second outil a été développé à partir du STESS pour optimiser la prédiction du risque de mortalité, à court terme, pour un patient présentant un EME (González-Cuevas et al. 2016) (Tableau 9).

	Etat de conscience avant traitement		Type de crises d'épilepsie			Âge du patient		Antécédents d'épilepsie		Score modifié de Rankin initial			Total
	Alerte Somnolent Confus	Stuporeux Comateux	Crises focales	Crises généralisées tonico-cloniques	EME non convulsif	< 70 ans	≥ 70 ans	Oui	Non	0	1 à 3	≥4	
Score	0	1	0	1	2	0	2	0	1	0	1	2	0 à 8

Tableau 9 : mSTESS, modified *Status Epilepticus Severity Score*. Adapté de Gonzalez-Cuevas et al. *European Journal of Neurology* 2016.

Le mSTESS utilise les mêmes variables cliniques que le STESS auxquelles est ajouté le *score modifié de Rankin* à l'état initial, c'est-à-dire avant l'EME (Figure 5). Cette dernière variable représente l'état fonctionnel du patient avant son EME, c'est-à-dire son autonomie dans les actes de la vie quotidienne (Bruno et al. 2010). Le seuil décisionnel de la variable « âge » a, par ailleurs, été modifié, de 65 à 70 ans, entre le STESS et le mSTESS.

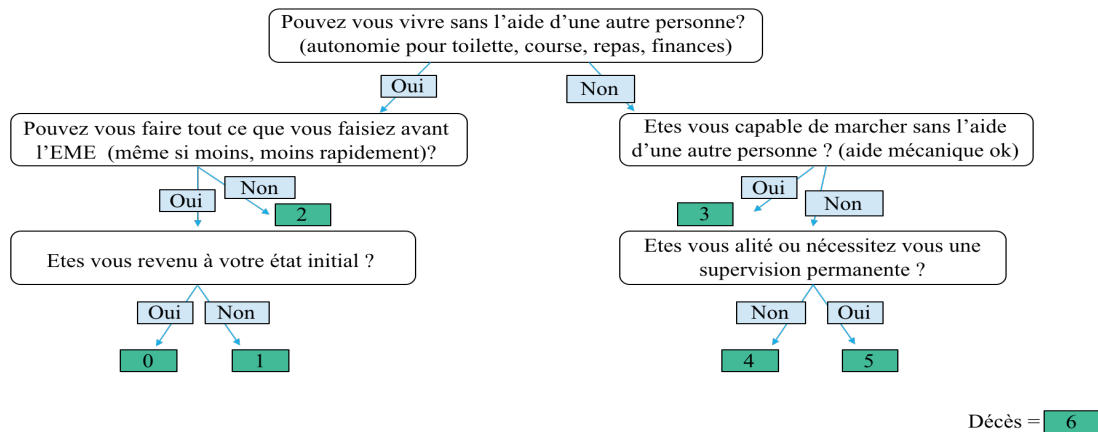


Figure 5 : Algorithme décisionnel pour le score modifié de Rankin. Adapté de Bruno et al. *Stroke* 2010.

Plus de 58% des patients présentant un score de mSTESS supérieur à 4 sont décédés des suites de l'EME, tandis que 87% des patients avec un score inférieur ou égal à 4 ont survécu (González-Cuevas et al. 2016). Le mSTESS a présenté une meilleure capacité que le STESS pour prédire le risque de décès dans la cohorte initiale (AUC de 0,801 pour le mSTESS contre 0,743 pour le STESS) (González-Cuevas et al. 2016). En revanche, aucune supériorité du mSTESS n'a été retrouvée dans les études conduites ultérieurement (Atmaca et al. 2017; Reindl et al. 2018).

Simple d'utilisation, ce score peut également être obtenu facilement pour tous les patients en EME. Cependant, tout comme le STESS, il repose sur des données obtenues en pré-hospitalier, avant l'instauration d'un traitement antiépileptique, et ne peut par conséquent pas être répété au cours de la prise en charge. Aucune étude n'a évalué son potentiel pour prédire le risque de dégradation des capacités fonctionnelles en sortie de réanimation.

*** EMSE, *Epidemiology-based Mortality score in Status Epilepticus***

Ce troisième outil a été développé pour prédire le risque de mortalité, à court terme, pour un patient présentant un EME (Leitinger et al. 2015b). Cet outil associe différentes variables : âge, comorbidités, étiologie de l'EME, durée de l'EME, résultats de l'EEG et état de conscience du patient. Ces variables peuvent être toutes ou partiellement assemblées pour obtenir un score de risque (Figure 6). L'EMSE repose sur la transformation de taux de mortalité en points. Par exemple, puisque 65% des patients présentant un EME post-anoxique vont décéder des suites de l'EME, l'étiologie « post-anoxique » comptera pour 65 points (Figure 6).

La combinaison des variables « étiologie », « âge », « comorbidités » et « EEG » présente les meilleures performances pour estimer le risque de décès dans les suites de l'EME. Trente à 69% des patients présentant un score EMSE supérieur à 64 points sont décédés à court terme dans les suites de l'EME (Leitinger et al. 2015b; Pacha et al. 2016; Giovannini et al. 2017; Ciurans et al. 2018; Yechoor et al. 2018). Par ailleurs, 64 à 88% des patients ayant des scores EMSE supérieurs à 40 ou 64 selon les études présentaient une dégradation de leurs capacités fonctionnelles dans les suites de l'EME (Gao et al. 2016; Giovannini et al. 2017; Ciurans et al. 2018).

Les performances de l'EMSE semblent moindres lorsque la variable « étiologie » n'est pas prise en compte : la combinaison des trois autres variables, « âge », « comorbidités » et « EEG », ne permet de prédire le décès que de 20% des patients de moins de 65 ans et 36% des patients de 65 ans ou plus (Jiang et al. 2021).

Les performances semblent également moindres en combinant les variables « étiologie », « âge » et « état de conscience », qui permettent de conclure à raison au décès du patient dans seulement 21 à 45% des cas, pour des seuils EMSE fixés entre 27 et 34 (Pacha et al. 2016; Yechoor et al. 2018; Jiang et al. 2021). Une seule étude a évalué l'intérêt de combiner les variables « âge », « état de conscience », « durée de l'EME » et « EEG ». Dans cette étude, 44% des patients présentant un score EMSE supérieur à 60 points sont décédés dans les suites de l'EME (Kang et al. 2016).

L'EMSE présente une bonne capacité à identifier les patients qui vont survivre à l'EME, et permet de prédire la survie pour 75 à 100% des patients (Leitinger et al. 2015b; Pacha et al. 2016; Giovannini et al. 2017; Ciurans et al. 2018; Yechoor et al. 2018; Jiang et al. 2021).

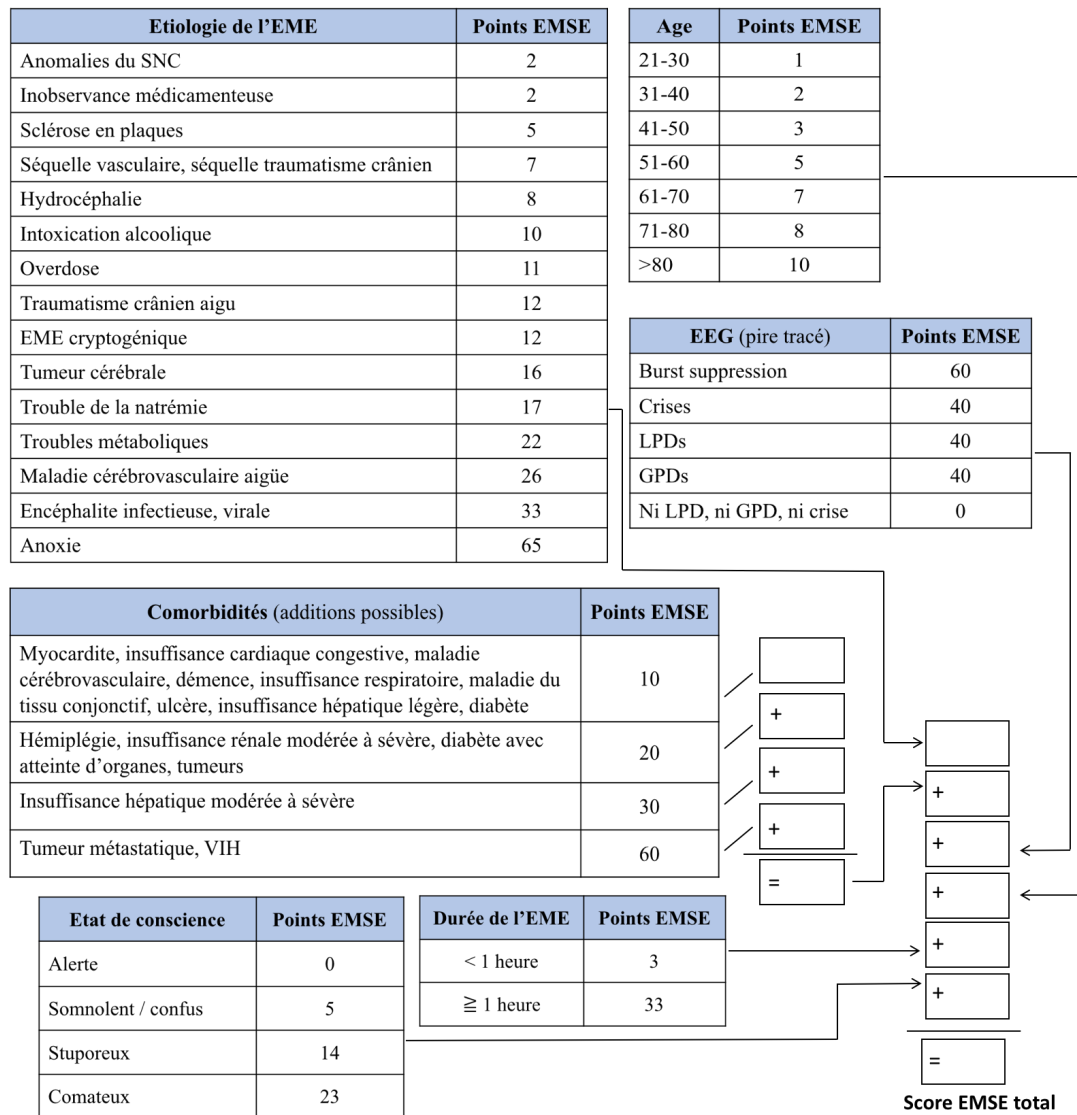


Figure 6 : EMSE, Epidemiology-based Mortality score in Status Epilepticus. Adapté de Leitinger et al. *Neurocritical Care* 2015.

L’EMSE prédit de façon efficace les chances de survie et les risques de décès dans les suites d’un EME. En revanche, cet outil présente une limite importante : il ne peut pas être appliqué à tout patient en EME car toutes les étiologies ne sont pas couvertes par cet algorithme. La principale étiologie manquante est le groupe des encéphalopathies dysimmunitaires alors qu’une étiologie dysimmune ou paranéoplasique est retrouvée chez plus d’un tiers des patients sans antécédent neurologique qui présentent un EME réfractaire (Gaspard et al. 2015). De plus, tout comme pour le STESS, les résultats hétérogènes ne permettent pas d’envisager l’EMSE comme un outil décisionnel pour décider d’un arrêt ou d’une limitation des thérapeutiques actives.

*** END-IT, Encephalitis, Nonconvulsive status epilepticus, Diazepam resistance, Image abnormalities and Tracheal intubation**

L’outil END-IT est le premier à avoir été développé pour prédire le pronostic fonctionnel des patients à la suite d’un EME convulsif (Gao et al. 2016). Cet outil repose sur cinq variables cliniques et paracliniques : la présence d’une encéphalite, l’évolution de l’EME vers un EME non convulsif, la résistance des crises au diazépam, la présence d’anomalies à l’imagerie cérébrale et la nécessité de recourir à une intubation orotrachéale (Tableau 10).

	Encéphalite		Evolution vers un EME non convulsif		Résistance des crises au diazépam		Anomalies à l’imagerie cérébrale			Intubation orotrachéale		Total
	Non	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Lésions bilatérales Œdème diffus	Lésions unilatérales	Pas de lésion	Non	Oui	
Score	0	1	0	1	0	1	2	1	0	0	1	0 à 6

Tableau 10 : END-IT, Encephalitis, Nonconvulsive status epilepticus, Diazepam resistance, Image abnormalities and Tracheal intubation.
Adapté de Gao et al. *Critical Care* 2016.

Soixante-dix pourcents des patients présentant un score END-IT supérieur à 3 ont présenté une dégradation de leurs capacités fonctionnelles et sont devenus dépendants pour les actes de la vie quotidienne. A l’inverse, l’EME n’a pas eu d’impact sur l’autonomie de 83% des patients ayant un score END-IT inférieur ou égal à 3 (Gao et al. 2016). En revanche, ce score présente une limite importante : il nécessite la réalisation d’une IRM cérébrale. Or, cet examen n’est pas systématiquement réalisé dans la prise en charge de l’EME (Outin et al. 2020).

Partie 2. Physiopathologie et biomarqueurs biochimiques des états de mal épileptiques

1. Physiopathologie et conséquences des états de mal épileptiques

1.1. Physiopathologie des EME

Les EME sont une maladie résultant soit d'un échec des mécanismes permettant l'arrêt des crises, soit de l'installation de mécanismes qui conduisent à des crises anormalement prolongées. La plupart des études se sont intéressées aux conséquences des EME. Ainsi, nous ne disposons que de peu d'informations sur les mécanismes à l'origine de l'émergence d'un EME et du passage crise-EME.

Plusieurs modifications cellulaires et moléculaires ont été observées à la suite de crises d'épilepsie dans des modèles animaux. Ces changements participent au déséquilibre de la balance excitation/inhibition, au profit d'une hyperexcitation, et promeuvent des mécanismes pro-épileptogènes, à l'origine de la persistance et de la récurrence des crises, voire d'un EME.

On retrouve notamment dans les premières millisecondes (Chen and Wasterlain 2006) :

- Une ouverture des canaux sodiques et calciques dépendant du voltage et une fermeture des canaux potassiques dépendant du voltage.
- Un relargage de neurotransmetteurs comme le glutamate qui, en se fixant sur ses récepteurs ionotropiques, aboutit à l'ouverture des canaux sodiques et calciques dépendant du voltage.
- Un relargage de médiateurs de l'inflammation qui peuvent moduler les fonctions neuronales et favoriser une hyperexcitabilité en stimulant les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) ou en augmentant l'excitabilité des neurones (Heida and Pittman 2005; Kleen and Holmes 2010; Maroso et al. 2010).

Ces changements sont suivis, au bout de quelques secondes, de deux autres modifications physiopathologiques impliquant le trafic des récepteurs ionotropiques (Chen and Wasterlain 2006). Il a premièrement été observé, à la suite de crises, un changement de l'expression des sous-unités des récepteurs GABA-A (acide gamma-aminobutyrique), une internalisation des récepteurs GABA-A synaptiques et une redistribution des récepteurs GABA-A dans les zones extra-synaptiques (Figure 7) (Chen and Wasterlain 2006; Niquet et al. 2016).

Les récepteurs GABA-A sont internalisés ou endocytés par des vésicules recouvertes de clathrine. Ils deviennent ainsi non accessibles aux benzodiazépines, ce qui favorise la persistance des crises en empêchant l'inhibition médiée par les récepteurs GABA-A (Figure 7) (Naylor et al. 2005; Niquet et al. 2016). Les récepteurs internalisés peuvent être transférés vers l'appareil de Golgi pour être recyclés à la membrane cellulaire ou être détruits dans les lysosomes (Figure 7) (Niquet et al. 2016).

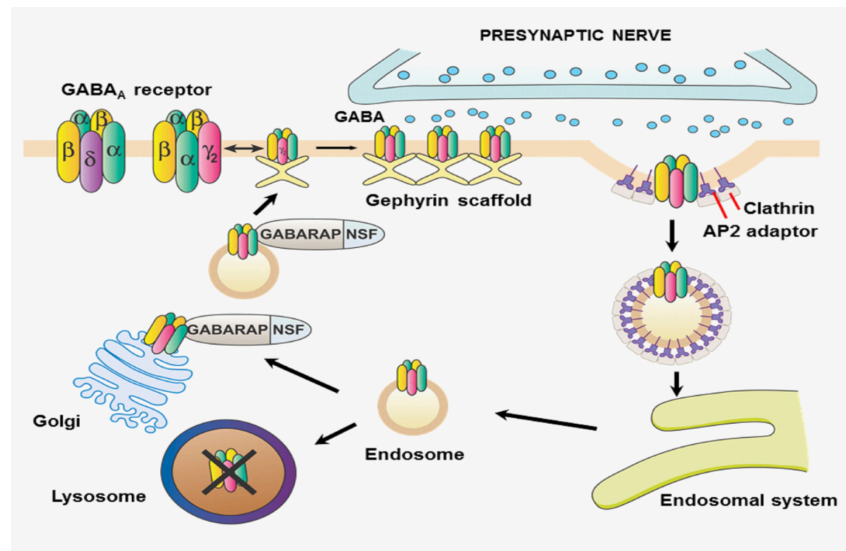


Figure 7 : Internalisation des récepteurs GABA-A.
Niquet et al. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2016.

Parallèlement, il a été observé, à la suite des crises, une augmentation des sous-unités des récepteurs NMDA et AMPA (acide aminométhylphosphonique) au niveau des synapses, aboutissant à une hyperexcitation des récepteurs NMDA et une libération accrue de substance P, un neuropeptide excitateur (Wasterlain et al. 2000; Chen and Wasterlain 2006; Niquet et al. 2016). Cet excès d'excitation observé dans les suites d'une crise peut participer à l'émergence d'un EME.

Ces mécanismes s'accompagnent au bout de plusieurs minutes d'une moindre libération de somatostatine et de neuropeptide Y, deux peptides connus pour diminuer la survenue des crises (Vezzani and Hoyer 1999; Cattaneo et al. 2020; Tekgul et al. 2020).

Plusieurs modèles expérimentaux ont été développés pour mimer ces effets et aboutissent à l'émergence d'un EME. Il s'agit, par exemple, de l'injection intracérébrale ou systémique d'un agoniste glutamatergique avec le modèle kaïnate, ou d'un antagoniste gabaergique (GABA-A) avec les modèles bicuculline ou pentylenetetrazole (Burman et al. 2020).

1.2. Conséquences précoces des EME

Les EME s'accompagnent de réponses physiologiques et pathologiques et ont des conséquences systémiques et cérébrales. Les réponses précoces s'organisent en deux phases (Engrand and Crespel 2009).

*** Première phase (pendant les 30 premières minutes) :**

La persistance des crises convulsives induit une demande métabolique accrue, à laquelle l'organisme répond par une forte décharge adrénergique. L'augmentation de la libération des catécholamines permet d'assurer un débit sanguin cérébral suffisant et s'accompagne (Walton 1993) :

- sur le plan cardiovasculaire, d'une augmentation du débit cardiaque, d'une hypertension artérielle et d'une tachycardie ;
- sur le plan métabolique, d'une hyperglycémie, d'une hyperthermie et d'une acidose marquée par une hyperlactatémie, qui peut être bénéfique ou délétère, pour le cerveau, selon son intensité (Calabrese et al. 1991; Sutter et al. 2018) ;
- sur le plan respiratoire, d'une hyperventilation pour augmenter les apports cérébraux en oxygène.

Lors de cette première phase, des troubles du rythme cardiaque peuvent être observés. Une mesure de la pression artérielle et un électrocardiogramme doivent ainsi être réalisés dès que possible après l'admission d'un patient présentant un EME (Walton 1993; Outin et al. 2020). Un contrôle rapide de la glycémie est nécessaire pour prévenir une hyperglycémie consécutive à l'EME. En effet, chaque augmentation de glycémie de 1 g/L a été associée à une majoration de 1,2% du risque de mauvais pronostic (Chiewthanakul et al. 2015). De même, la prise en charge efficace et rapide de l'hyperthermie est nécessaire pour limiter le développement de lésions neuronales. L'hypothermie thérapeutique a été proposée comme traitement associatif pour les EME réfractaires. En revanche, cette stratégie thérapeutique ne dispose que d'un faible niveau de preuve et présente de nombreux effets indésirables, tels que des thromboses veineuses, des embolies pulmonaires ou des infections, qui limitent son utilisation en pratique clinique courante (Ochoa et al. 2021).

*** Deuxième phase (entre la 30^{ème} et la 60^{ème} minute) :**

Cette seconde période est marquée par un accroissement des besoins métaboliques cérébraux. En dépit de la décharge adrénergique accrue, l'organisme ne parvient plus à répondre à ses besoins et on va observer en conséquence (Walton 1993) :

- sur le plan cardiovasculaire, une diminution du débit cardiaque et une hypotension artérielle systémique voire un collapsus ;
- sur le plan métabolique, une hypoglycémie, une déshydratation, une rhabdomyolyse, une acidose métabolique, une hyperkaliémie et une dysfonction hépatique et rénale ;
- sur le plan respiratoire, une hypoxie secondaire aux besoins croissants en oxygène, et une hypercapnie avec acidose respiratoire. Ces altérations favorisent la survenue d'un œdème aigu pulmonaire ;
- sur le plan neurologique : une augmentation de la pression intracrânienne et une baisse du débit sanguin cérébral.

1.3. Conséquences tardives des EME

La compréhension des conséquences tardives des EME repose majoritairement sur les études conduites dans des modèles animaux d'EME. Quatre réponses pathologiques principales ont été décrites dans les suites d'un EME : une mort neuronale, une neuroinflammation, un changement de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et une gliose.

* La mort neuronale

Si seul l'EME tonico-clonique généralisé présente un risque vital dès les premières heures en raison de ses effets systémiques, la persistance de toute crise d'épilepsie peut causer des lésions neuronales, diffuses ou focales, principalement hippocampiques à l'origine de séquelles neurocognitives et du développement d'une épilepsie secondaire (Figure 8).

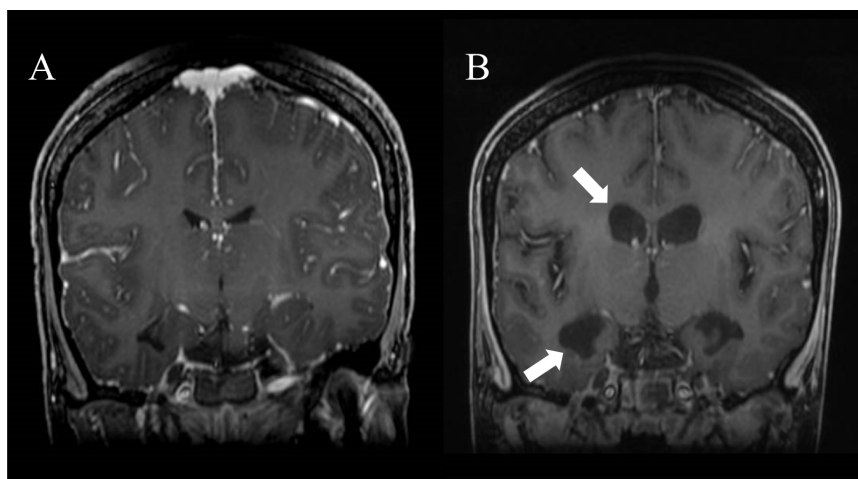


Figure 8 : Évolution de l'IRM cérébrale d'une patiente présentant un état de mal réfractaire *de novo*. Les IRM ont été réalisées au début de l'EME généralisé (A) et après 8 semaines (B). Les séquences coronales T1 montrent une atrophie majeure sur la seconde IRM (B), touchant les régions corticales et sous-corticales et marquées par un élargissement des ventricules et une atrophie hippocampique.

Au sein de l'hippocampe, les neurones des régions CA1, CA3 et du hile semblent présenter une susceptibilité accrue à l'excitotoxicité (Figure 9) (Walker 2018). Une mort neuronale a également été décrite dans des régions corticales extratemporales, mais aussi dans le thalamus et le cervelet, à la suite d'un EME (Corsellis and Bruton 1983; Jutila et al. 2002).

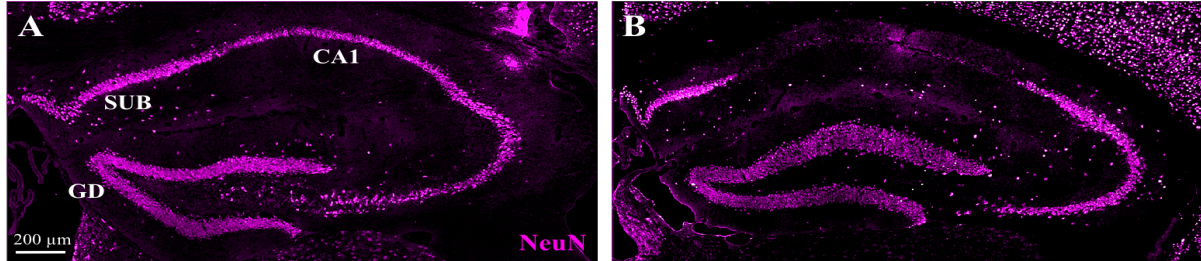


Figure 9 : Mort neuronale hippocampique dans les suites d'un état de mal épileptique. Les neurones hippocampiques sont marqués avec des anticorps anti-NeuN. On note une diminution de la densité neuronale en CA1, 15 jours après le début d'un état de mal épileptique induit par une injection d'une solution de kainate (B), par rapport aux animaux ayant reçu une injection contrôlée de phosphate-buffered saline (A).

Les atteintes systémiques précoces survenant dans les suites d'une crise d'épilepsie prolongée (acidose, hypoxie, hypotension) peuvent favoriser le développement de lésions neuronales (Walker 2018). La mort neuronale semble induite par l'accumulation de calcium intracellulaire. L'entrée accrue de calcium dans la cellule peut résulter d'une dysfonction mitochondriale ou d'une activation de divers récepteurs, comme le récepteur NMDA, le récepteur AMPA et les récepteurs P2X, activés par la libération massive d'ATP dans les suites d'une crise (Walker 2018).

L'entrée de calcium dans les neurones peut favoriser la mort cellulaire à travers divers mécanismes (Walker 2018) :

- Activation d'enzymes clés des voies d'apoptose comme la caspase 3, caspase exécutrice ou effectrice, ou encore la calpaïne 2, cystéine protéase à activité dépendant du calcium (Henshall et al. 2000; Araújo et al. 2008).
- Activation d'enzymes de synthèse du monoxyde d'azote (NOS, *nitric oxide synthase*) et particulièrement de la NOS 1 cérébrale, dépendant du complexe calcium-calmoduline. Le monoxyde d'azote synthétisé en excès va se complexer à des ions superoxydes et former des peroxy-nitrites. Les peroxy-nitrites sont neurotoxiques à haute concentration et provoquent une atteinte de l'ADN, une peroxydation lipidique et un dysfonctionnement mitochondrial (Moncada and Bolaños 2006).

- Production en excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) qui peuvent contribuer à la mort cellulaire à travers une peroxydation lipidique, des dommages de l'ADN et une ouverture du mPTP (*mitochondrial Permeability Transition Pore*) qui favorise l'entrée dans le cytoplasme de protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome c (Camello-Almaraz et al. 2006).

*** Neuroinflammation**

Une neuroinflammation a été décrite dans les suites d'un EME, dans des modèles animaux et chez l'Homme (Tan et al. 2021). Elle se manifeste par la libération, massive et rapide, de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qui favorisent le recrutement de cellules immunitaires effectrices et la diapédèse leucocytaire (Rana and Musto 2018). Les macrophages et les monocytes ont été décrits fortement activés à la suite de crises d'épilepsies, dans des modèles animaux d'épilepsie pharmacorésistante et chez l'Homme (Broekaart et al. 2018). Il a également été rapporté une augmentation des polynucléaires neutrophiles et du ratio neutrophiles/lymphocytes dans les suites d'une crise (Güneş and Büyükgöl 2020).

Si l'implication de la neuroinflammation dans les changements de perméabilité de la BHE, la gliose et l'épileptogénèse secondaire repose sur des fondements solides ; les mécanismes à l'origine de cette neuroinflammation sont eux mal connus.

*** Changement de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique**

Le cerveau est isolé du reste de l'organisme par la BHE. La BHE est composée d'une barrière cellulaire comprenant des astrocytes, des péricytes et des cellules endothéliales et d'une barrière physique constituée de jonctions serrées et de transporteurs (Figure 10). Elle contrôle étroitement les échanges entre le compartiment sanguin et le compartiment cérébral et assure le maintien de l'homéostasie cérébrale en permettant le passage par diffusion des nutriments indispensables au fonctionnement du cerveau, l'évacuation des déchets et la protection contre les substances pathogènes présentes en périphérie (Buclin and Biollaz 2005).

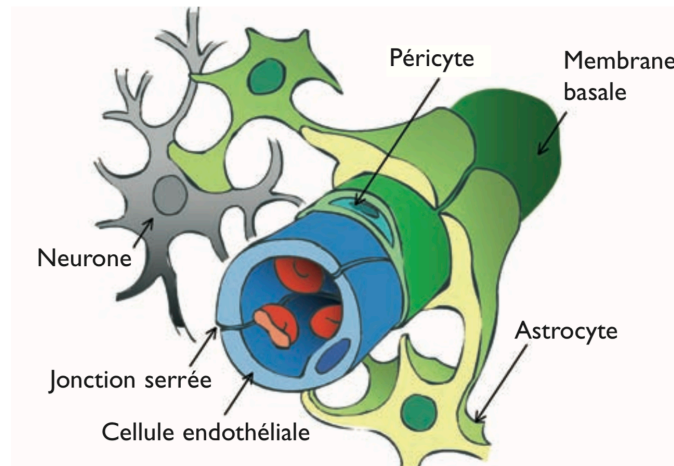


Figure 10 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique.
Buclin et Biollaz. *Revue Médicale Suisse* 2005.

Une perturbation des jonctions serrées associée à un moindre recouvrement de l'endothélium vasculaire par les péricytes a été observée, à la suite de crises, dans un modèle murin d'épilepsie (Klement et al. 2019). Plusieurs arguments suggèrent un rôle de la neuroinflammation et des leucocytes dans l'atteinte de la BHE (Figure 11). Parallèlement à l'infiltration leucocytaire, observée dans les suites d'un EME, il a été décrit un renforcement de l'adhésion des leucocytes aux protéines d'adhésion VCAM-1 et P-selectin de la BHE (Kleen and Holmes 2008). Les leucocytes, qui ont adhéré à la BHE, peuvent la traverser par diapédèse ce qui déclenche une réaction inflammatoire à l'origine de sa rupture (Kleen and Holmes 2008) (Figure 11).

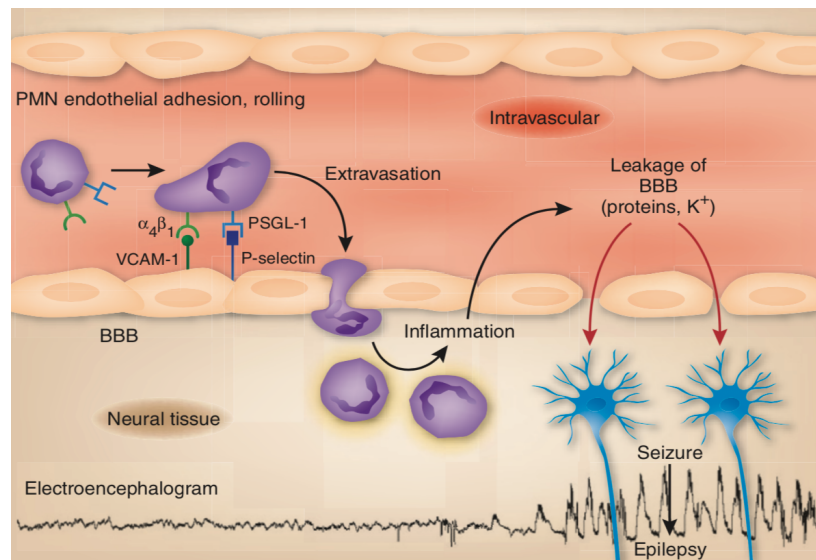


Figure 11 : Rôle des leucocytes dans la rupture de la BHE et l'épileptogénèse.
Kleen et al. *Nature Medicine* 2008.

BBB = *Blood-Brain Barrier*; PMN = *Polymorphonuclear Leukocytes*

*** Gliose**

Une activation précoce des cellules gliales et notamment des astrocytes a été observée dans les suites d'un EME et d'une crise isolée, chez l'Homme et l'animal (Figure 12) (Gurnett et al. 2003; Vizuite et al. 2017).

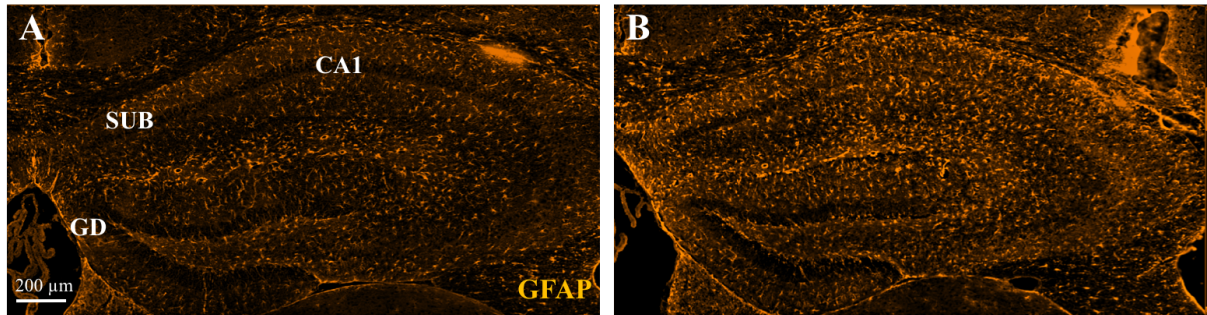


Figure 12 : Gliose hippocampique dans les suites d'un état de mal épileptique. Les astrocytes hippocampiques sont marqués avec des anticorps anti-GFAP. On note une gliose en CA1, 15 jours après le début de l'EME induit par une injection d'une solution de kaïnate (B), par rapport aux animaux ayant reçu une injection contrôle de phosphate-buffered saline (A).

Le changement de perméabilité de la BHE facilite le passage dans le tissu neuronal de constituants plasmatiques, comme l'albumine, qui est connue pour participer à l'induction d'une gliose (Frigerio et al. 2012). L'activation des cellules gliales aboutit à une synthèse accrue de cytokines qui peuvent en conséquence recruter de nouvelles cellules immunitaires, amplifier l'excitotoxicité et favoriser la survenue d'une épileptogénèse secondaire (Gorter et al. 2015) (Figure 13).

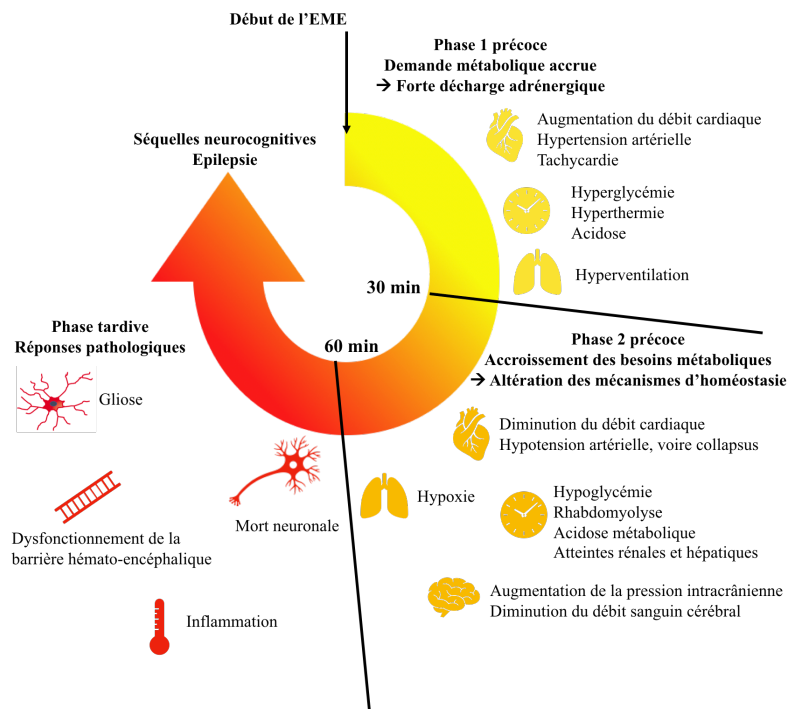


Figure 13 : Conséquences précoces et tardives des états de mal épileptiques.

2. Biomarqueurs biochimiques des états de mal épileptiques

Selon la *Food and Drug Administration* (FDA) et le *National Institute of Health* (NIH), un biomarqueur est une « caractéristique définie qui est mesurée comme un indicateur des processus biologiques normaux, des processus pathogènes ou des réactions à une exposition ou une intervention, y compris les interventions thérapeutiques » (FDA-NIH Biomarker Working Group 2016). Les biomarqueurs peuvent être qualitatifs ou quantitatifs et de différentes natures (biomarqueurs biochimiques ou biologiques, biomarqueurs d'imagerie, biomarqueurs génétiques, ...). Ils peuvent être utilisés pour diagnostiquer des maladies, surveiller l'efficacité et la sécurité d'un traitement, identifier des groupes de patients pour lesquels une thérapie ciblée pourrait être proposée ou encore comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement ou l'évolution d'une pathologie.

2.1. Les critères d'un bon biomarqueur biochimique

Le biomarqueur biochimique idéal pour poser le diagnostic d'une maladie est une molécule présente dans les fluides biologiques des malades et absente chez les sujets sains. Toutefois, aucun biomarqueur ne répond parfaitement à cette définition et un compromis doit être trouvé entre la sensibilité, définie comme « la probabilité que le marqueur soit présent si le patient est malade », et la spécificité, définie comme « la probabilité que le marqueur soit absent si le patient est sain ». Il convient, en pratique, d'identifier le seuil optimal de chaque biomarqueur permettant d'obtenir une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Le choix du seuil s'effectue à l'aide de la courbe ROC et de l'index de Youden, calculé comme « Sensibilité + Spécificité – 1 » (Fluss et al. 2005) (Figure 14).

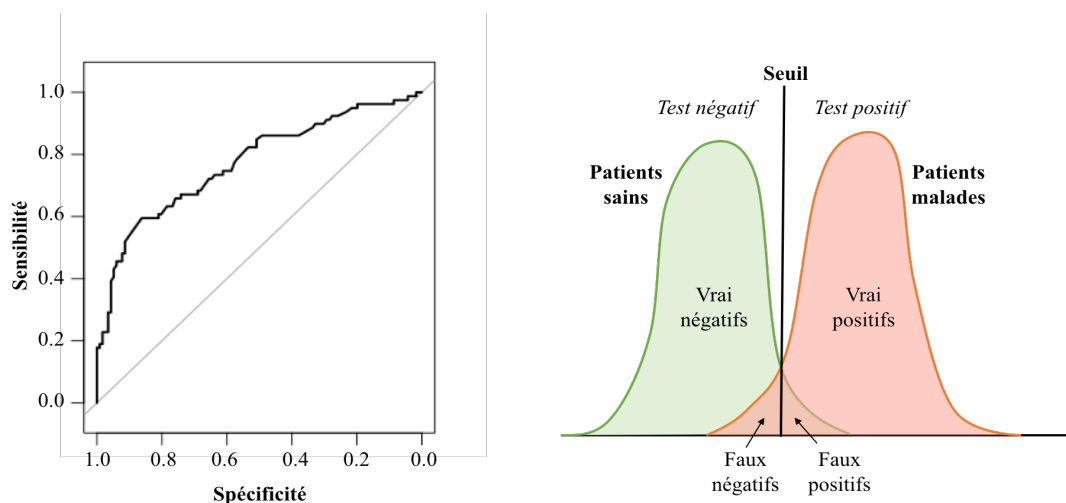


Figure 14 : Courbe ROC et distribution des résultats possibles d'un test.

La différence statistique des deux populations (malades et sains) n'empêche pas la présence de faux positifs « le marqueur est présent mais le patient est sain », ni de faux négatifs « le marqueur est absent bien que le patient soit malade » (Figure 14). Deux autres paramètres permettent d'évaluer un biomarqueur : sa valeur prédictive positive, définie comme « la probabilité que le patient soit malade si le marqueur est présent », et sa valeur prédictive négative, définie comme « la probabilité que le patient soit sain si le marqueur est absent ».

Selon l'objectif du biomarqueur, nous pouvons être amenés à favoriser l'un des paramètres d'évaluation, en fixant un seuil différent du seuil défini par l'index de Youden :

- Si nous disposions d'une stratégie thérapeutique permettant d'éviter l'apparition de lésions neuronales dans les suites d'un EME réfractaire, alors il faudrait disposer d'un biomarqueur capable d'identifier tous les patients à risque, c'est-à-dire un biomarqueur avec une bonne sensibilité et une bonne valeur prédictive négative (Figure 15).

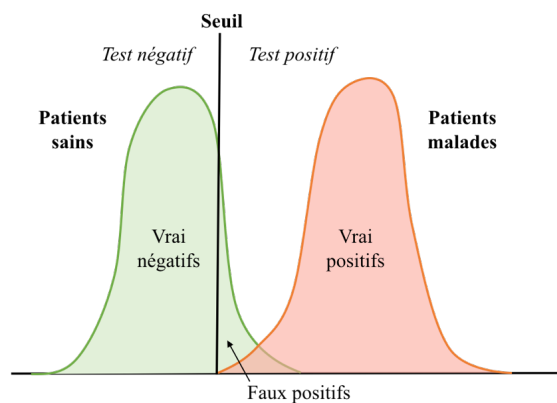


Figure 15 : Sélection d'un seuil permettant une bonne sensibilité.

- En revanche, pour une stratégie thérapeutique avec un rapport bénéfices/risques favorable pour un groupe limité de patients, il faut pouvoir disposer d'un biomarqueur permettant d'identifier uniquement ce groupe de patients. Le biomarqueur devrait ainsi avoir une bonne spécificité et une bonne valeur prédictive positive (Figure 16).

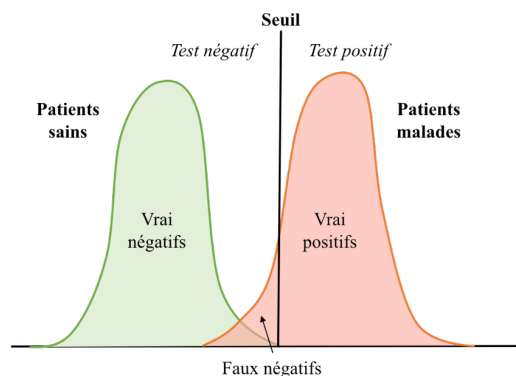


Figure 16 : Sélection d'un seuil permettant une bonne spécificité.

Le biomarqueur biochimique idéal doit également être facile à analyser, par tout laboratoire de biochimie. Les résultats doivent être reproductibles entre deux laboratoires et au sein d'un même laboratoire entre deux analyses. On mesure pour cela le coefficient de variation (CV), calculé comme le rapport de l'écart-type à la moyenne. Un CV inférieur à 5% est classiquement recherché pour les dosages par méthode automatique tandis que l'on accepte des CV légèrement plus élevés (< 15%) pour les méthodes manuelles.

Dans une situation d'urgence, un biomarqueur diagnostique ne pourra être utilisé que si le résultat peut être obtenu de façon rapide. En revanche, des biomarqueurs biochimiques pour lesquels les résultats peuvent être obtenus en quelques semaines peuvent être utiles pour diagnostiquer des pathologies neurodégénératives chroniques.

Un biomarqueur biochimique idéal doit également refléter les conséquences physiologiques ou pathologiques d'une maladie.

En conclusion, le biomarqueur idéal dépend de la pathologie cible, des capacités d'analyses et de l'objectif fixé.

2.2. Intérêts des biomarqueurs biochimiques pour les EME

Des biomarqueurs biochimiques pourraient être utilisés pour optimiser le diagnostic, l'évaluation étiologique, le suivi, la prise en charge thérapeutique et l'évaluation pronostique des EME.

*** Diagnostic des EME**

Le diagnostic des EME convulsifs, cliniquement typiques, repose sur l'examen clinique. En revanche, le diagnostic des EME non convulsifs n'est aujourd'hui pas possible sans l'EEG (Beniczky et al. 2013). Or, cet examen n'est pas toujours disponible en urgence. Une étude récente a montré que 15% des patients ayant présenté des crises non épileptiques psychogènes d'une durée supérieure à 30 minutes avaient été à tort considérés en EME et pris en charge en réanimation (Mezouar et al. 2021). Des biomarqueurs biochimiques avec une bonne valeur prédictive positive et dont les résultats pourraient être obtenus rapidement pourraient grandement aider pour le diagnostic de l'EME.

* Évaluation étiologique des EME

L'étiologie de l'EME est un facteur prédominant dans l'évaluation pronostique des patients (Rossetti et al. 2013). L'identification de l'étiologie peut permettre la mise en place d'un traitement adapté, comme pour les encéphalites auto-immunes associées à la présence d'anticorps anti-récepteurs NMDA. Si l'instauration précoce de traitements immunomodulateurs favorise le contrôle des EME d'origine inflammatoire et diminue le risque de séquelles, il n'y a pas de consensus thérapeutique pour tous les EME (Tan et al. 2021). Des biomarqueurs biochimiques permettant d'identifier les dérégulations immunitaires spécifiques des patients pourraient être utilisés pour instaurer un traitement immunomodulateur personnalisé.

* Suivi des patients en EME

Des crises d'épilepsie non-convulsives et un EME non convulsif surviennent fréquemment à la suite d'un EME convulsif, respectivement dans 33,5% et 20,2% des cas (Limotai et al. 2019). La récurrence des crises expose les patients au risque d'excitotoxicité et de lésions neuronales. Ainsi, les réanimateurs doivent trouver le meilleur compromis entre (i) une sédation prolongée qui augmente la durée du séjour en réanimation et à l'hôpital et les risques liés à l'anesthésie générale et (ii) une baisse rapide des sédations qui augmente le risque de récurrence des crises et les séquelles neurologiques associées (Figure 17). L'équilibre de cette balance est aujourd'hui assuré par la surveillance EEG continue. Des biomarqueurs biochimiques permettant d'estimer le risque de récurrence de crise pourraient être utilisés, en association à l'EEG, pour optimiser le suivi et la prise en charge thérapeutique des EME.

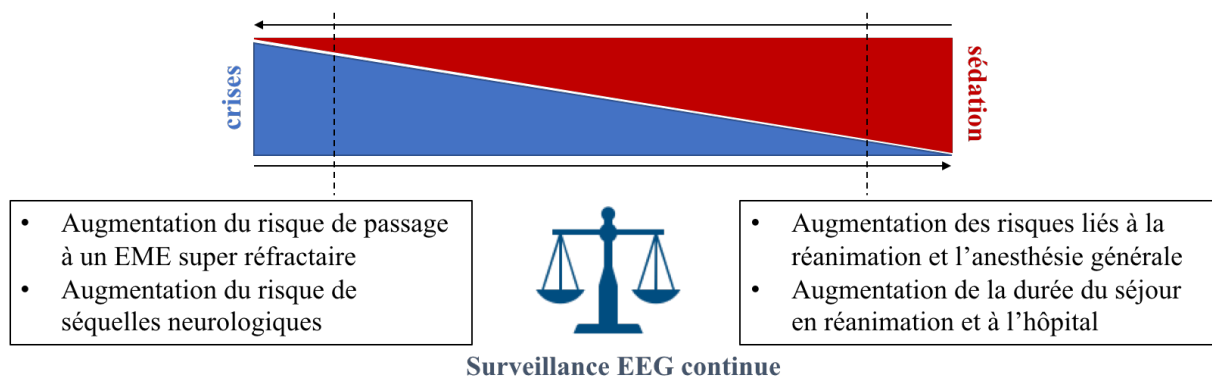


Figure 17 : Balance de risques crises/sédation après un état de mal épileptique.

* Prise en charge thérapeutique des EME

Les biomarqueurs biochimiques doivent refléter les changements cellulaires ou moléculaires induits par une pathologie.

De nombreuses complications, telles que la mort neuronale et la gliose, ont été décrites dans les suites d'un EME. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques responsables des lésions neuronales pourrait permettre d'identifier des biomarqueurs clés et de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques de neuroprotection. Par exemple, s'il était avéré que l'entrée accrue de calcium en intracellulaire provoquait une activation délétère des caspases 3 résultant en une mort neuronale, alors nous pourrions envisager une stratégie thérapeutique de neuroprotection basée sur des inhibiteurs de caspase 3.

*** Évaluation pronostique des EME**

Quatre échelles ont été proposées ces quinze dernières années pour évaluer le pronostic des patients en EME (Rossetti et al. 2006; Leitinger et al. 2015b; Gao et al. 2016; González-Cuevas et al. 2016). Cependant, aucune de ces échelles ne peut être utilisée en routine et de façon répétée pour optimiser l'évaluation pronostique de tous les patients en EME. L'association, aux données cliniques, de marqueurs biologiques, disponibles dans tout laboratoire de biochimie, pourrait permettre d'évaluer le pronostic de tout patient en EME et de suivre l'impact d'une nouvelle stratégie thérapeutique sur le pronostic des patients.

2.3. Quels biomarqueurs pour refléter les conséquences précoces et tardives des EME ?

De nombreux changements cellulaires et moléculaires ont été décrits dans les suites d'un EME. Plusieurs biomarqueurs biochimiques, dosables dans le sang et le liquide céphalo-rachidien (LCR), ont été envisagés pour refléter ces changements et aider au diagnostic et à l'évaluation pronostique des patients en EME.

*** Biomarqueurs de l'acidose**

Une acidose est observée de façon précoce dans les suites d'un EME. Deux biomarqueurs biochimiques ont été suggérés pour refléter l'acidose métabolique : les lactates et le pH.

Une étude conduite chez 29 patients ayant présenté un EME généralisé, avec des étiologies variables, a retrouvé une augmentation des concentrations de lactates dans le LCR chez tous les patients, en comparaison à une population contrôle (Calabrese et al. 1991). Cette étude a suggéré un intérêt pronostique de la teneur en lactates : les patients qui présentaient un pronostic défavorable, en sortie de réanimation, avaient des concentrations de lactates plus élevées que les patients avec un bon pronostic (Calabrese et al. 1991).

Une diminution du pH a par ailleurs été observée, chez le rat, 5 minutes après l'induction de l'EME par une injection de bicuculline (Sokrab et al. 1989).

*** Biomarqueurs de la mort neuronale**

La Neuron Specific Enolase (NSE), ou enolase-2, a été suggérée comme un biomarqueur de l'atteinte cérébrale survenant dans les suites d'un EME. Les enolases sont des enzymes exprimées dans le cytoplasme de tout tissu réalisant la glycolyse. Elles catalysent la conversion du 2-phospho-D-glycerate en phosphoenolpyruvate et sont des enzymes clés de la glycolyse anaérobie. La NSE est exprimée par les neurones et les cellules neuroendocriniennes.

Une augmentation des concentrations de NSE, dans le sérum et le LCR, a été décrite dans les suites d'une crise d'épilepsie généralisée et chez les patients souffrant d'épilepsie focale pharmacorésistante, avec un pic de concentration retrouvé entre 6 et 12 heures après le début de la crise (Royds et al. 1983; Rabinowicz et al. 1996; Tuman et al. 1999; Palmio et al. 2008). Une augmentation des concentrations de NSE dans le LCR a été observée dans une première cohorte constituée de 11 patients admis pour un EME de cause cryptogénique ou séquellaire (Correale et al. 1998). Une augmentation des concentrations sériques de NSE a également été décrite chez 19 patients admis pour un EME, avec un pic entre 24 et 48 heures après le début de l'EME (DeGiorgio et al. 1995), et ce, quelle que soit l'étiologie de l'EME (DeGiorgio et al. 1999). Par ailleurs, les concentrations élevées de NSE étaient associées à un pronostic défavorable et une durée d'EME plus élevée (DeGiorgio et al. 1995).

Des résultats similaires ont été décrits dans des modèles animaux d'EME : une augmentation des concentrations sériques de NSE a été observée, chez le rat, après l'induction d'un EME par une injection de lithium-pilocarpine (Sankar et al. 1997).

Si les mécanismes responsables de l'augmentation des concentrations sériques de NSE sont mal connus, nous pouvons suggérer le rôle d'un changement de perméabilité de la BHE (Correale et al. 1998), associé à la libération de cette enzyme par les neurones en cas de mort neuronale.

La visinin-like protein 1 (VILIP-1) a également été suggérée comme biomarqueur pour refléter l'atteinte neuronale post-critique. Une augmentation des concentrations sériques de VILIP-1 a été observée chez 58 patients, avec un pic entre 12 et 24 heures après la fin de la crise (Tan et al. 2020). Néanmoins, ce marqueur dispose d'un niveau de preuve plus faible que la NSE.

L'atteinte neuronale peut également être suivie en immunohistochimie par le marquage de l'anticorps NeuN ou par une coloration de Nissl (Neurotrace). Une diminution de la densité neuronale a ainsi pu être observée chez la souris dans les suites d'un EME (Zhang et al. 2015; Chali et al. 2019). Cette technique nécessite le recours au tissu cérébral et ne peut donc pas être utilisée en routine pour le suivi de l'EME.

*** Biomarqueurs de la neuroinflammation**

Une neuroinflammation, responsable d'une synthèse accrue de cytokines, a fréquemment été décrite dans les suites d'un EME.

Une augmentation de l'expression astrocytaire de l'High Mobility Group Box 1 (HMGB1), un marqueur inflammatoire, a été observée dans le modèle murin d'EME induit par une injection de kaïnate ainsi que sur des coupes de tissus hippocampiques réalisées à partir de pièces opératoires provenant de patients opérés pour une épilepsie pharmacorésistante secondaire à une sclérose de l'hippocampe (Maroso et al. 2010). L'utilisation d'antagonistes de l'HMGB1 a permis de retarder l'apparition des crises d'épilepsie spontanées après un EME et d'en diminuer la fréquence (Maroso et al. 2010).

Des résultats hétérogènes ont été rapportés quant à l'intérêt de l'interleukine 1-bêta (IL-1 β) comme biomarqueur de l'EME. Une étude a rapporté une augmentation des concentrations d'IL-1 β , dans le LCR, chez des enfants présentant des crises généralisées tonico-cloniques (Shi et al. 2017). Une seconde étude rapporte des concentrations d'IL-1 β abaissées dans le LCR dans les suites de crises focales ou de crises tonico-cloniques (Lehtimäki et al. 2010). Des résultats discordants ont également été rapportés concernant l'impact des crises sur les concentrations sériques d'IL-1 β (Lehtimäki et al. 2007; Alapirtti et al. 2009). Peu d'études ont évalué l'impact d'un EME sur les concentrations d'IL-1 β . Néanmoins, une étude récente rapporte une augmentation des concentrations sériques d'IL-1 β dans les NORSE et FIRES (Jun et al. 2018). Une augmentation rapide et persistante de l'ARNm de l'IL-1 β a également été retrouvée dans les hippocampes de rats injectés par une solution de kaïnate (Vezzani et al. 1999; Lehtimäki et al. 2003). Un traitement par l'Anakinra, antagoniste du récepteur à l'IL-1 β , a ainsi été proposé pour la prise en charge des FIRES et a présenté des résultats encourageants (Dilena et al. 2019). L'interleukine 6 (IL-6) a également été suggérée comme biomarqueur de l'EME. Une augmentation des concentrations sériques d'IL-6 a été retrouvée en post-critique, chez l'Homme et dans des modèles animaux d'EME (Lehtimäki et al. 2004, 2007). L'IL-6 est également décrite comme fortement augmentée dans le sérum et le LCR des patients NORSE/FIRES (Sakuma et al. 2015; Kenney-Jung et al. 2016; Kothur et al. 2019; Tan et al. 2021). Un traitement par Tocilizumab, inhibiteur de l'IL-6, a par conséquent été proposé et rapporté efficace pour certains patients avec un syndrome de FIRES résistant à l'Anakinra (Jun et al. 2018; Cantarín-Extremera et al. 2020; Stredny et al. 2020).

D'autres cytokines, comme l'IL-2 ou le TNF- α , ont également été décrites comme augmentées à la phase aigüe des NORSE et FIRES (Tan et al. 2021).

*** Biomarqueurs du changement de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique**

Un changement de perméabilité de la BHE pourrait être responsable de la gliose et de l'épileptogénèse observées secondairement à un EME (van Vliet et al. 2007). Suite au changement de perméabilité de la BHE, l'albumine, synthétisée par le foie, peut rejoindre le parenchyme cérébral et devient dès lors mesurable dans le LCR. Le ratio des concentrations de l'albumine dans le LCR et dans le sérum a été ainsi proposé pour refléter l'intégrité de la BHE (Tibbling et al. 1977). Une augmentation du ratio LCR/sérum a été rapportée chez 11 patients présentant un EME et 31 patients présentant des crises généralisées tonico-cloniques, en comparaison à deux populations contrôles (Correale et al. 1998; Li et al. 2013).

Le sitostérol, stérol végétal apporté uniquement par l'alimentation, a également été suggéré pour refléter la perméabilité de la BHE (Saeed et al. 2015).

*** Biomarqueurs de la gliose**

Deux biomarqueurs ont été suggérés pour refléter la gliose secondaire à l'EME : la protéine S100-bêta et la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP).

La protéine S100-bêta est une petite protéine synthétisée par les cellules astrocytaires et les cellules de Schwann. Elle participe à la régulation de la disponibilité intracellulaire du calcium libre et à la survie des neurones (Donato 2001). Une augmentation des concentrations sériques de la protéine S100-bêta a été décrite à la suite d'une crise isolée chez l'Homme (Freund et al. 2015; Meguid et al. 2018; Asadollahi and Simani 2019; Parvareshi Hamrah et al. 2020). Une augmentation des concentrations de la protéine S100-bêta a été observée, dans le sérum et dans le LCR, dans le modèle murin d'EME induit par une injection de pilocarpine (Vizuete et al. 2017).

La GFAP est un filament intermédiaire du SNC, exprimé exclusivement par les astrocytes. Une augmentation des concentrations de GFAP dans le LCR a été notée, chez des enfants, à la suite d'une crise isolée (Gurnett et al. 2003). La durée des crises et leur sévérité étaient corrélées positivement aux concentrations de GFAP dans le LCR (Gurnett et al. 2003). En revanche, l'étiologie des crises ne semblait pas impacter les concentrations de GFAP. Chez l'animal, il a également été observé une augmentation du marquage GFAP dans l'hippocampe et le cortex à la suite d'un EME (Chali et al. 2015; Vizuete et al. 2017).

* Biomarqueurs de l'atteinte axonale

Deux protéines reflétant l'atteinte axonale ont été proposées comme des biomarqueurs de l'EME : la protéine tau et la sous-unité lourde des neurofilaments (NFH, *neurofilament heavy chain*) (Palmio et al. 2009; Rejdak et al. 2012).

Les concentrations de la protéine tau étaient augmentées dans le LCR chez la moitié des patients admis pour EME et indemnes d'une atteinte cérébrale aiguë, d'une encéphalite ou d'une maladie neurodégénérative (Monti et al. 2015). Plus les concentrations de la protéine tau étaient élevées, plus les patients avaient un risque élevé de présenter un EME réfractaire (Monti et al. 2015).

Des concentrations élevées de NFH ont été observées dans le LCR de patients présentant un EME ou des crises généralisées tonico-cloniques répétitives, en comparaison à des patients témoins (Rejdak et al. 2012). Cependant, aucune n'étude n'a à ce jour évalué l'impact pronostique de ce biomarqueur chez des patients en EME.

* Biomarqueurs de la neurogenèse

Des biomarqueurs biochimiques peuvent refléter la sévérité d'un EME ou les mécanismes neuroprotecteurs qui résultent de l'adaptation du cerveau à l'excitotoxicité.

La progranuline est une protéine responsable de la croissance des neurites. Une augmentation des concentrations de progranuline a été observée, dans le LCR, après un EME ou une crise généralisée tonico-clonique (Huchtemann et al. 2015). La durée de l'EME ne semblait pas modifier les concentrations de progranuline (Huchtemann et al. 2015). Une augmentation de l'ARNm de la progranuline a également été notée dans le cortex et l'hippocampe, 48 à 96 heures après le début de l'EME induit chez le rat par une injection de lithium-pilocarpine (Zhu et al. 2013). L'augmentation de l'ARNm de la progranuline reflétait une activation des cellules microgliales et potentialisait l'activation microgliale (Zhu et al. 2013).

Une augmentation de la concentration de facteurs neurotrophiques comme le VEGF ou le BDNF a également été observée dans les suites d'un EME (Simonato and Zucchini 2010; Lenzer-Fanara et al. 2017). Cette augmentation était associée à une réduction des atteintes neuronales et une diminution de la fréquence des crises survenant spontanément après l'EME (Simonato and Zucchini 2010).

2.4. Revue 1: Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus. Epilepsia.


Nous avons fait une revue de la littérature des études conduites, dans des modèles animaux d'EME et chez l'Homme entre 1983 et 2018, pour identifier des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de l'EME (Hanin et al. 2020).

En dépit de résultats prometteurs, aucun biomarqueur biochimique n'est aujourd'hui validé pour la prise en charge des EME. Les études ont été conduites selon un protocole non optimal, sur un trop faible nombre de patients ou sans contrôles (Simon et al. 2009; Gnanapavan et al. 2014).

Cependant, trois biomarqueurs présentent un profil intéressant :

- La Neuron Specific Enolase : elle présente de bonnes caractéristiques physiologiques et physico-chimiques, telles qu'une spécificité neuronale, une bonne stabilité dans les fluides biologiques, et un lien avec la souffrance neuronale. De plus, les premiers résultats obtenus sont prometteurs : l'augmentation des concentrations de NSE a été retrouvée de façon homogène entre les études et les concentrations ont été trouvées liées au pronostic et à la durée de l'EME. Néanmoins, des conditions pré-analytiques strictes doivent être respectées car la NSE augmente de façon importante en cas d'hémolyse (Ramont et al. 2005).
- La protéine S100-bêta : elle a été principalement étudiée à la suite d'une crise isolée. Cependant, la protéine S100-bêta pourrait représenter un biomarqueur intéressant pour le diagnostic et le pronostic de l'EME. Cette protéine est exprimée dans le cerveau puis libérée dans le sang en cas d'atteinte de la BHE. Une augmentation des concentrations a été décrite dans un modèle murin d'EME et cette molécule peut être dosée rapidement. Néanmoins, les résultats ne peuvent être interprétés qu'avec les données cliniques, car les concentrations de la protéine S100-bêta augmentent en cas de traumatisme crânien (Beaudeau and Laribi 2013).
- La progranuline : cette protéine possède un niveau de preuve plus faible que la NSE. Dosée par ELISA, cette molécule ne peut pas être envisagée comme un biomarqueur diagnostique d'urgence de l'EME. En revanche, la progranuline reflète l'activation de la microglie. Ainsi, elle pourrait être un marqueur étiologique intéressant pour l'EME en permettant d'identifier les EME de cause inflammatoire, plus sujets à une activation microgliale. D'autres études sont nécessaires pour comprendre si l'augmentation des concentrations de progranuline témoigne d'un processus inflammatoire délétère ou de l'instauration de mécanismes neuroprotecteurs pour lutter contre cette inflammation.

Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus

Aurélie Hanin¹ | Virginie Lambrecq^{1,2,3} | Jérôme Alexandre Denis^{3,4} |
 Françoise Imbert-Bismut⁴ | Benoît Rucheton⁴ | Foudil Lamari⁴ |
 Dominique Bonnefont-Rousselot^{4,5} | Sophie Demeret² | Vincent Navarro^{1,2,3} 

¹Brain and Spine Institute, ICM, Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Université, Paris, France

²Epilepsy Unit (VL, VN) and Neuro-Intensive care Unit (SD), Neurology Department, AP-HP, GH Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Paris, France

³Sorbonne Université, Paris, France

⁴Department of Endocrine and Oncological Biochemistry (J.AD), Metabolic Biochemistry (BR, DBR, FI, FL), AP-HP, GH Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Paris, France

⁵UTCBS, U 1022 Inserm, UMR 8258 CNRS, Paris University, Paris, France

Correspondence

Vincent Navarro, Epilepsy Unit, Brain and Spine Institute, ICM, Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Université, F-75013, Paris, France and AP-HP, GH Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, France.
 Email: vincent.navarro@aphp.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-10-IAIHU-06

Abstract

Status epilepticus is a condition resulting either from the failure of the mechanisms responsible for seizure termination or from the initiation of mechanisms that lead to abnormally prolonged seizures and require urgent administration of antiepileptic drugs. Refractory status epilepticus requires anesthetic drugs and may lead to brain injury with molecular and cellular alterations (eg, inflammation, and neuronal and astroglial injury) that could induce neurologic sequels and further development of epilepsy. Outcome scores based on demographic, clinical, and electroencephalography (EEG) condition are available, allowing prediction of the risk of mortality, but the severity of brain injury in survivors is poorly evaluated. New biomarkers are needed to predict with higher accuracy the outcome of patients admitted with status in an intensive care unit. Here, we summarize the findings of studies from patients and animal models of status epilepticus. Specific protein markers can be detected in the cerebrospinal fluid and the blood. One of the first described markers of neuronal death is the neuron-specific enolase. Gliosis resulting from inflammatory responses after status can be detected through the increase of S100-beta, or some cytokines, like the High Mobility Group Box 1. Other proteins, like progranulin may reflect the neuroprotective mechanisms resulting from the brain adaptation to excitotoxicity. These new biomarkers aim to prospectively identify the severity and development of disability, and subsequent epilepsy of patients with status. We discuss the advantages and disadvantages of each biomarker, by evaluating their brain specificity, stability in the fluids, and sensitivity to external interferences, such as hemolysis. Finally, we emphasize the need for further development and validation of such biomarkers in order to better assess patients with severe status epilepticus.

KEYWORDS

critical care, epilepsy, inflammation, neuronal injury, prognosis

1 | INTRODUCTION

Epilepsy is one of the most common neurologic disorders; it affects approximately 0.7% of the population.¹ Status epilepticus (SE), is a condition resulting either from the

failure of the mechanisms responsible for seizure termination or from the initiation of mechanisms that lead to abnormally prolonged seizures.² Most SE can be treated with adequate antiepileptic drugs, and such patients generally recover well. Nevertheless, in approximately 25%

of cases, SE is refractory and requires anesthetic drugs.³ For these patients, SE may lead to brain injury with cellular and molecular alterations (eg, inflammation, or neuronal and astroglial injury) that could induce subsequent irreversible neurologic sequels (Figure 1), further development of epilepsy, with a mortality rate ranging from 7% to 39%.⁴ Difference in mortality depends on the semiology of SE (increased mortality in nonconvulsive SE with coma), the level of consciousness (increased case fatality rate in patients with impaired consciousness), and age (increased mortality in subjects over 65 years).^{4,5}

New biomarkers combined with clinical data, electroencephalography (EEG) (Figure 2), and magnetic resonance imaging (MRI) (Figure 1), may help clinicians to predict SE outcome with more accuracy.^{6,7} Cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers have already been established in neurologic diseases such as Alzheimer disease, Parkinson disease, multiple sclerosis, or in the traumatic brain.^{8–11} In SE, even if CSF biomarkers have been proposed, none have been yet validated in clinical use to diagnose SE or predict its clinical outcome.

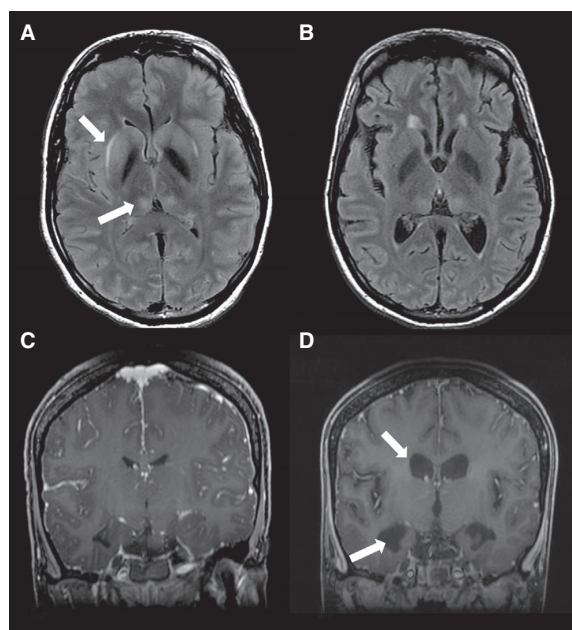


FIGURE 1 Progressive brain magnetic resonance imaging (MRI) changes in a 17-year-old patient with new-onset prolonged refractory status epilepticus. MRI was performed a few days after the onset of a generalized status epilepticus (A, C) and after 8 weeks (B, D). Axial fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) sequences (A, B) showed an initial hypersignal in the claustrum and the pulvinar (arrows). Coronal T1 sequences (C, D) showed major atrophy on the second MRI (D), affecting both cortical and subcortical regions, that is, enlargement of ventricles and hippocampal atrophy (arrows)

Key Points

- Refractory status epilepticus is associated with molecular and cellular changes that may induce brain injury with neuronal loss and subsequent epilepsy
- Specific biomarkers can be detected in the fluids and the brain tissues obtained from patients and animal models of status epilepticus
- Neuron-specific enolase protein is a useful biomarker of the neuronal loss for which the highest levels were correlated with the worst outcome
- Elevated cytokines levels could suggest infectious or autoimmune status epilepticus and identify specific etiologies requiring individualized treatments
- Further studies with longitudinal follow-up of these biomarkers and clinical data are needed to better evaluate their prognosis value in status epilepticus

In this review, we provide an overview of the current research on promising biomarkers of SE in CSF and blood (Table 1, Figure 3). We present arguments for further development and validation of such biomarkers, and for their use in assessing patients with SE.

2 | HOW BIOMARKERS CAN HELP MANAGEMENT OF SE?

There is a large number of possible clinical presentations of SE (ie, focal SE, absence SE, generalized convulsive SE, myoclonic SE, nonconvulsive SE).¹² The diagnosis of convulsive SE relies mainly on clinical assessment. On the other hand, the diagnosis of nonconvulsive SE relies on EEG recording (Figure 2), which requires specialized clinical staff and equipment that are not available to all medical units at all times. Although clinical semiology and EEG are the best features for a positive diagnosis of SE, non-EEG biomarkers would be of great help, in particular, for the diagnosis of the nonconvulsive SE.

Clinical SE prognosis factors, such as generalized convulsive status, patients of advanced age, and long duration of SE have been correlated with higher mortality rate.⁴ But the most important outcome factor is the underlying etiology: patients with postanoxic SE or SE related to an acute brain injury have a higher mortality rate than patients with a SE related to antiepileptic drug withdrawal. Nevertheless, consequences of SE from a single type of etiology are heterogeneous. Outcome scores based on demographic, clinical, and EEG conditions are available.¹³ However, they predict a bad

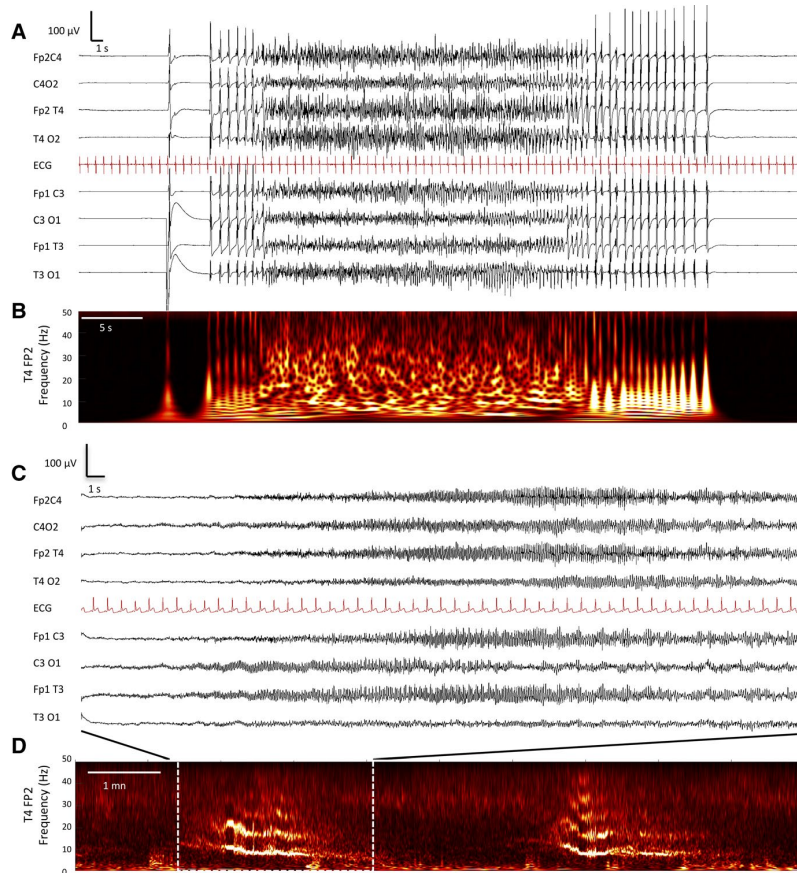


FIGURE 2 Major electroencephalography (EEG) changes during status epilepticus. Extract of an EEG (A), of a bipolar montage, from the same patient, as in Figure 1, showing long periods of isoelectric activity (first seconds of the trace) related to high doses of barbiturate, which alternate with repetitive seizures starting and ending with high-amplitude spikes. Time frequency analysis (B) of the EEG signal shows the spectral signature of a seizure. Extract of an EEG (C), of a bipolar montage, from a 20-year-old patient presenting with a refractory status epilepticus related to a N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis. EEG shows a continuous waxing and waning of ictal activity. Time frequency analysis (D) of a longer period (10 min) showing the spectral signature of two seizures. The spectral signature of the seizure C is shown in the dotted box

outcome (ie, death) but the severity of brain injury in survivors is poorly evaluated. New biomarkers are needed to predict with a higher accuracy the outcome of patients admitted with SE to an intensive care unit. Even if some biochemical biomarkers are not specific to SE, we assume that they can be combined with clinical and paraclinical data (EEG and MRI) to help clinicians predict SE outcome.

Biomarkers that can identify SE etiology may be very useful in clinical practice. There are now guidelines to identify the etiology of SE in the acute phase.¹⁴ The Status Epilepticus Etiology Identification Tool (SEEIT) is based on semiology, head computerized tomography (CT) scan, and on first-level blood tests (eg, blood glucose, basic metabolic panel, and antiepileptic drug levels, if appropriate). According to these first results, this tool aims to propose more specific blood or CSF tests.¹⁴ We can speculate on our future ability to isolate specific biomarkers of acute causes of SE. Similarly, we may identify biomarkers such as cytokines levels or specific interleukins that could suggest infectious or autoimmune SE.

Biomarkers may also be used to identify specific etiologies requiring individualized treatments. Thereby, a recent use of interleukin 6 (IL-6) monoclonal antibodies has been proposed specifically in New-Onset Refractory Status

Epilepticus (NORSE) and IL-1 receptor antagonist in Febrile Infection-Related Epilepsy Syndrome (FIRES).¹⁵

3 | PHYSIOLOGIC RESPONSES TO STATUS EPILEPTICUS AND LATE CONSEQUENCES

A good fluid biomarker is a molecule (a) whose measurements in fluid provides high sensitivity and high specificity tests; (b) whose biochemical assessment is easy, quick, and reliable; and (c) that is stable in the body fluids and demonstrates links to molecular and cellular alterations that occur in SE.

During SE, physiologic responses occur first, and then pathologic late consequences can lead to neuronal death and subsequent epilepsy.

During convulsive SE, some physiologic changes occur outside of the brain; many of them may worsen the acute brain injury. These changes include (a) hyperthermia¹⁶; (b) immediate and marked increase in plasma catecholamine concentrations, which may provoke increased cerebral blood flow¹⁷; (c) hypoglycemia; and (d) marked and rapidly developing acidosis, which could be beneficial or

TABLE 1 Potential CSF and blood biomarkers in status epilepticus

Pathophysiology	Research findings in CSF/ brain tissues		Research findings in blood		Prognostic value	Advantages	Current limitations
	Biomarker	Animal models	Humans	Animal models			
Acidosis	Lactate	/	Levels are elevated in patients with generalized SE ³⁸	/	/	Quick biochemical assessment	Not specifically associated with SE No study performed on nonconvulsive SE
	pH	/	/	pH fell 5 minutes after the induction of epileptic seizures ³⁰	/	Magnitude of elevation as indicator of morbidity or mortality ²⁸	
Acute neuronal injury	NSE	/	Increase of NSE levels in patients with cryptogenic/symptomatic SE ³⁵	Elevated levels in a lithium-pilocarpine animal model of SE ²¹	Levels peak at 24–48 h after the onset of SE, normalized at 7 days ³⁶ Highest level in subclinical generalized convulsive SE ³⁷	Good neuronal specificity High stability in body fluid Correlation to neuronal death, duration, and outcome of SE	High sensitivity to hemolysis Serum levels could be decreased by two major antiepileptic drugs (bias for prognostic evaluation)
	Blood-brain barrier breakdown	CSF-serum albumin ratio	/	Increase of the ratio in patients with SE and generalized tonic-clonic seizures in comparison to controls ^{35,42}	/	/	/
Gliosis	S100-B	Increase from the first day to the late period (56 days) ⁴⁸	/	Decrease of S100-B at one day after the lithium-pilocarpine injection and elevation at 14 days ⁴⁸	Higher S100-B levels in epileptic patients ⁴⁷	Almost brain-specific Release in blood only in case of BBB breakdown	No study conducted in blood or CSF of SE patients
	GFAP	Increase staining in hippocampus ⁵⁰	Elevated CSF GFAP levels in children after seizures ⁴⁹	/	CSF GFAP correlated with SE severity ⁴⁹	No extracerebral production of GFAP	Need more study with larger cohorts and longitudinal follow-up to validate its prognostic interest
Neuroinflammation	IL-1β	Increase of IL-1β mRNA in the hippocampus ^{56,57}	Increase of IL-1ra and decrease of IL-1β ⁵²	/	Discordant results ^{53,54}	/	Unstable molecule
	IL-6	/	/	Increase blood levels in all studies ^{53,58}	Increase blood levels in all studies ^{53,58}	/	Unstable molecule
	HMGBI	Increase staining after kainic acid and in human epileptic tissues ⁵¹	/	/	/	Good stability in blood	No study conducted in human body fluids

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Pathophysiology	Biomarker	Research findings in CSF/ brain tissues		Research findings in blood		Prognostic value	Advantages	Current limitations
		Animal models	Humans	Animal models	Humans			
Axonal injury	Tau	/	Higher CSF levels in 50% of patients with SE ⁶⁰	/	/	Higher CSF tau levels in patients with refractory SE, disabilities and chronic epilepsy ⁶⁰	Correlation to SE outcome	Influence of anesthetics drugs No study conducted in blood samples No study conducted in blood samples
	NFH	/	Higher levels in patients with SE and repetitive generalized tonic-clonic seizures ⁶²	/	/	/	/	No study conducted in blood samples
Neurogenesis	Programulin	Increase of the mRNA in the hippocampus and cortex at 48-96 h ⁶³	Increased levels of PGRN in patients with SE ²⁴	/	/	No impact on clinical outcome ²⁴	/	No study conducted in blood samples

Note: Summary of clinical and preclinical studies.

Abbreviations: GFAP, glial fibrillary acidic protein; HMGB1, High Mobility Group Box 1; NFH, neurofilament heavy chain protein; NSE, neuron-specific enolase.

harmful for the brain, as the acidosis is, respectively, modest or significant.¹⁸

Our understanding of the late consequences of SE and epileptogenic processes comes largely from animal models of induced SE. Epileptogenesis refers to the phenomenon in which an initial brain insult (eg, traumatic brain injury, stroke, or SE) triggers a cascade of molecular and cellular changes that eventually culminate in the occurrence of spontaneous seizures. Five leading changes can be identified after an SE.

(a) One major change is the neuronal death. The origin of this acute neurodegeneration comes primarily from excitotoxic processes. It was described in the hippocampus and amygdala as well as in many extratemporal areas including the thalamus.¹⁹ The therapies used to reduce neurodegeneration decrease the behavioral consequences after SE in rats.²⁰ Neuronal loss can be evaluated by the blood concentration of specific proteins such as neuronal markers.²¹

(b) Increased neurogenesis could be detected within a few days and remained up to 4 weeks after the onset of SE.²² This process may reflect the brain's adaptation to the neuronal death,²³ and can be evaluated by the levels of mediators involved in neuronal growth factor, such as progranulin (PGRN).²⁴ Nevertheless, neurogenesis is limited to some brain areas, especially the hippocampus.

(c) Gliosis results from inflammatory responses.^{25,26} An increased expression of glial cell markers glial fibrillary acidic protein (GFAP) and proteins secreted by glial cells (eg, cytokines and chemokines) was reported, as a consequence of cytokine release during excitotoxic processes and glial cell activation related to cleaning processes after neuronal death. Gliosis may modify ionic homeostasis and further enhance neuronal excitability.

(d) Blood-brain barrier (BBB) breakdown may contribute to the development of epileptogenesis via a direct mechanism (influx of potassium) or via the leakage of serum proteins in the brain causing glial cell activation as well as inflammation and impaired potassium buffering.²⁷

(e) Axonal injury can be evaluated by measuring tau protein in the cerebrospinal fluid.

4 | POTENTIAL CEREBROSPINAL FLUID AND BLOOD BIOMARKERS OF STATUS EPILEPTICUS

Cerebrospinal fluid (CSF) is a source of promising biomarkers. CSF is in close contact with the extracellular space of the brain compared to the plasma or the serum, and its composition closely reflects biochemical changes that occur in the brain.^{8,9} CSF biomarkers have already been established in neurologic diseases such as Alzheimer disease, Parkinson disease, multiple sclerosis, or in traumatic brain injury.⁸⁻¹¹

In SE, even if CSF biomarkers have been proposed, none has yet been validated for clinical use. Some proteins

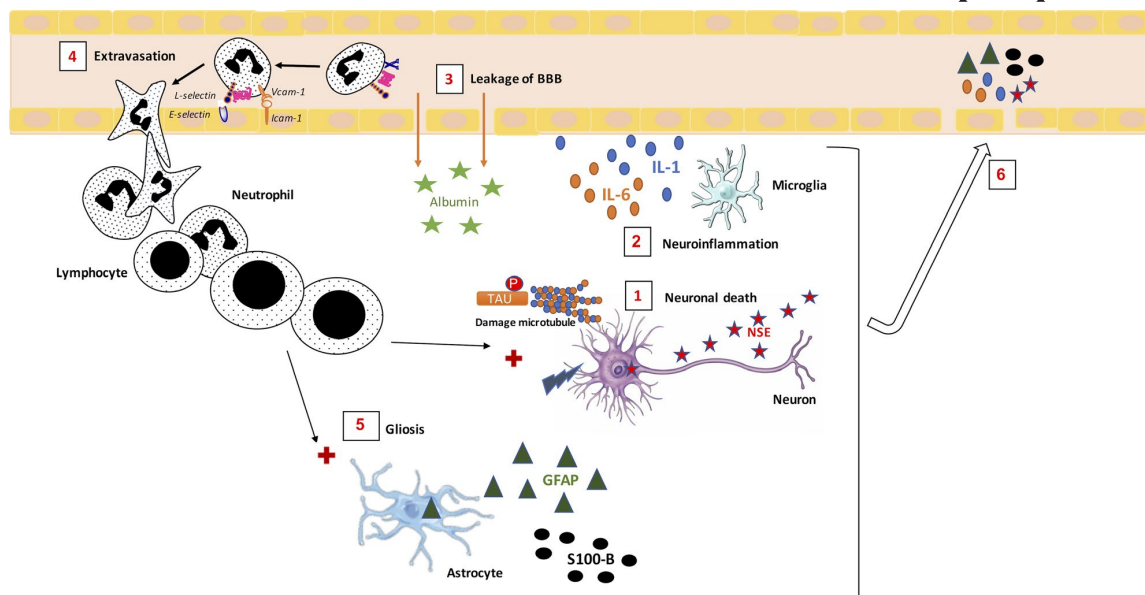


FIGURE 3 Biomarkers related to the pathophysiology of status epilepticus. During status epilepticus, molecular and cellular changes occur: Neuronal death is followed by the release of neuron-specific enolase (1) and neuroinflammation with production of cytokines (2). The blood-brain barrier is disrupted; albumin may worsen the inflammatory process (3) and leukocytes can be attracted (4). All these processes result in gliosis (5) that can be identified by GFAP and S100-B analysis. All these molecules could cross the blood-brain barrier and be measured in the blood samples (6). Abbreviations: BBB, blood-brain barrier; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IL, interleukin; NSE, neuron-specific enolase.

that are highly expressed in the brain (eg, S100-B, Neuron Specific Enolase (NSE), and cytokines) can be detected in the serum, even if in low concentrations. It will be very useful to benefit from the blood biomarkers of SE because a lumbar puncture is invasive, not systematically performed in routine clinical care for patients in SE, and cannot be easily repeated for days- or weeks-long kinetic studies and patient follow-up.

Here we present an overview of biomarkers relating to the pathophysiology of SE.

5 | ACIDOSIS

A marked and rapidly developing acidosis is noted in patients with SE and in animal models of SE. In humans, a study conducted in 29 adult patients with generalized SE of various etiologies showed an increase of CSF lactate for all SE patients with a mean at 3.74 ± 0.31 mmol/L compared to control subjects (1.60 ± 0.10 mmol/L).²⁸ This study suggested that the magnitude of lactate elevation may serve as a predictive indicator of morbidity or mortality because patients with poor outcome had significantly higher CSF lactate levels (5.36 ± 0.58 mmol/L) than patients who recovered well (3.01 ± 0.22 mmol/L). However, CSF lactate elevation is common after acute brain injury and might not be specific to convulsive SE.²⁹

Acidosis was also observed in a rat model of SE induced by injection of bicuculline, with the pH falling from 7.41 ± 0.06 to 6.91 ± 0.48 5 minutes after induction of epileptic seizures.³⁰

However, acidosis could also occur after intense muscle contraction. Although lactate is elevated after muscle contraction, which is obviously potentially increased after convulsive SE, acidosis is not specifically associated with SE. Nevertheless the correlation between CSF lactate and outcome is promising, and acidosis might provide a relevant biomarker of SE.

6 | ACUTE NEURONAL INJURY

Markers of neuronal injury like NSE, also called enolase-2, could provide an estimate of the degree of brain injury in SE. Enolase is an enzyme expressed in the cytoplasm of all tissues that can perform glycolysis. It catalyzes the conversion of 2-phospho-D-glycerate to phosphoenolpyruvate, and represents a key enzyme of anaerobic glycolysis (a reaction that drives glucose to lactate). Many isoenzymes have been described, depending on which subunits (alpha, beta, gamma) make up the dimers. In the nervous system, glial cells express the $\alpha\alpha$ isoform. Neurons express the NSE, a very stable homodimer of γ subunits with a half-life of around 24 hours. It is found in the central and the peripheral nervous system or

neuroendocrine tissue, particularly in cells from the APUD system (Amine Precursor Uptake Decarboxylation). Its assay is performed using a monoclonal antibody specific for the γ subunit.

NSE levels were first studied in relation to focal or generalized seizures.³¹ Patients with frequent seizures or pharmaco-resistant seizures showed elevated levels of NSE in both serum and CSF.³² However, there are conflicting findings for correlation between NSE levels and seizure duration.^{33,34}

An increase of CSF concentrations of NSE was first reported in 9 of 11 patients with cryptogenic/remote symptomatic SE (without any acute neurologic insult for more than one month), compared to 12 control subjects. The mean of CSF-NSE concentrations was higher in SE patients than in control patients (30.8 ± 18.33 vs 10.76 ± 3.08 ng/mL).³⁵ In a prospective study monitoring serum NSE in 19 patients with sustained SE including 11 without any acute neurologic insult for more than 1 month, NSE dosages were carried out at 24, 48, and 72 hours, and 7 days after the diagnosis of SE.³⁶ The mean peak of serum NSE for the entire group (24.87 ng/mL) and for the 11 patients without an acute neurologic insult (15.44 ng/mL), at 24 and 48 hours after the onset of SE, was increased in comparison to the levels for normal controls (5.36 ng/mL) and controls with epilepsy (4.61 ng/mL). NSE was normalized at 7 days after SE. Moreover, outcome was highly correlated with the peak of serum NSE: Serum NSE levels were inversely correlated with the Glasgow Outcome Scale score at 1 week. NSE levels also correlated with the duration of SE: In patients with normal NSE levels at the onset of the SE, SE was significantly shorter than in patients with higher NSE levels.³⁶ In another study, serum NSE levels were measured in four subtypes of SE: complex partial SE, absence SE, generalized convulsive SE, and acute symptomatic myoclonic SE (of which one-third is secondary to anoxia).³⁷ NSE was significantly elevated in all four subtypes compared to control subjects (5.02 ng/mL), and NSE levels were higher in complex partial SE (23.88 ng/mL) and in acute symptomatic myoclonic SE (37.83 ng/mL). No significant modification in the levels of NSE were found in patients with remote symptomatic SE (ie, patients without any acute neurologic insult for more than 1 month, or who had chronic epilepsy or drug withdrawal) when compared with acute symptomatic SE (ie, patients with any neurologic insult within 1 month including anoxia).³⁷ The highest level of NSE in acute symptomatic myoclonic SE was correlated with the worst outcome, in accordance with the Glasgow Outcome Scale.

Similar results were observed in rats with SE induced by lithium-pilocarpine. In this model, serum NSE levels increased from 5.4 ± 0.4 ng/mL (mean \pm SD) in the control condition to 30.4 ± 1.3 ng/mL after SE. Elevation of serum

NSE levels after SE correlated with overall histologic evidence for brain damage.²¹

Elevated levels of NSE in the serum may be explained by an increased permeability of the blood-brain barrier.³⁵ NSE has a good neuronal specificity—except in tumoral context—and seems to be correlated with the duration and the outcome of SE, two critical requirements for a valid prognosis biomarker. Nevertheless, two antiepileptic drugs commonly used in clinical practice (ie, carbamazepine and oxcarbazepine) could decrease serum NSE levels.³⁸ Moreover, NSE is highly sensitive to hemolysis in peripheral blood as well as in CSF. Indeed, NSE levels are markedly increased by *in vitro* lysis of erythrocytes and thrombocytes, and an artificial increase of NSE level could be seen, since the hemoglobin concentration is up to 47 mg/dL.³⁹ An adapted pre-analytical approach is needed to avoid hemolysis for a good monitoring of this biomarker.

Therefore, despite good characteristics (good neuronal specificity, stability in the body fluid, links to cellular alterations that occur in SE [ie, neuronal death], and a good correlation with the duration and outcome of SE), NSE is not currently used as a validated biomarker of SE.

7 | BLOOD-BRAIN BARRIER INTEGRITY

The BBB is the most important vascular barrier of the central nervous system (CNS). It is constituted by a specialized vascular endothelium that interacts with astrocytes, neurons, and pericytes and that limits penetration of a variety of substances from the blood into the brain. An increased number of spontaneous seizures in pilocarpine-exposed rats was observed in rats with greater BBB dysfunction, suggesting a potential direct role of BBB dysfunction in epileptogenesis.⁴⁰ BBB dysfunction can be measured by the CSF/serum albumin ratio.⁴¹ Albumin is synthesized mainly in the liver; therefore most of albumin in CSF is derived from blood via passage across the BBB. An increase of the CSF/serum albumin ratio, indicating BBB damage, is found in patients with various CNS disorders, such as inflammatory diseases, brain tumors, or traumatic brain injury.

An increase of the CSF/serum albumin ratio was reported in 11 patients with SE (33.4×10^{-3}) compared to 20 control patients (4.79×10^{-3}).³⁵ A higher CSF/serum albumin ratio was found for 31 patients with generalized tonic-clonic seizures compared to 25 patients without seizure (8.4 ± 2.6 vs 4.7 ± 1.4).⁴²

8 | ACUTE ASTROGLIAL INJURY

The leakage of serum proteins in the brain due to a BBB dysfunction could lead to glial activation and inflammation. In

SE, increased expression of markers of glial cells (GFAP) and proteins produced by glial cells (eg, cytokines, chemokines, and protein S100-beta also called S100-B) has been reported.

The S100 proteins are a family of calcium-binding proteins with both intracellular and extracellular functions such as the maintenance of cytoskeleton structure, the intracellular communication, the regulation of the cell cycle and energy metabolism, and a role in nerve cells growth. The S100 proteins are composed of two subunits (alpha and beta), forming dimeric structures (ie, $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, or $\beta\beta$). The protein S100-B has at least one beta subunit. S100-B was previously thought to be specific to astrocytes and Schwann cells but S100-B was also detected, albeit at low concentrations, in extracerebral cell types (eg, chondrocytes, adipocytes, melanocytes). S100-B has renal elimination and a half-life in blood of around 1.5 hours. At nanomolar concentrations, S100-B can enhance survival of neurons during development and stimulate neurite outgrowth in cortical neurons.⁴³ In comparison, micromolar levels of S100-B have toxic effects by inducing apoptosis and stimulating the expression of proinflammatory cytokines.⁴⁴ S100-B was proposed as a biomarker of neurologic disorders thanks to its expression in brain and CSF, its low concentrations in the serum of normal subjects, its possible extravasation in cases of BBB disorder, and its release from cellular lysis.⁴⁵ An increase of CSF and serum S100-B levels was reported in acute brain injury such as in traumatic brain injury in proportionate terms with the severity of injury.⁴⁶

S100-B was studied in isolated seizures. We conducted a study to evaluate the performance of S100-B and copeptin in addition to clinical variables, in predicting the outcome of patients hospitalized in emergency departments following seizures.⁴⁷ S100-B serum levels were shown to be higher in patients who experienced unfavorable outcome (death, hospitalization, seizure recurrence, rehospitalization, or a return to the emergency department within 7 days) in comparison with other patients. Nevertheless, this biomarker did not improve the prediction of poor outcome following seizures.⁴⁷ To the best of our knowledge, no other study evaluated S100-B as a biomarker in SE patients.

The dynamic of astroglial alterations was studied in the lithium-pilocarpine rat model of SE. S100-B CSF levels were increased from the first day (during SE) to the late period marked by the occurrence of spontaneous seizures, suggesting astroglial activation after the onset of SE.⁴⁸ In the serum, S100-B levels were decreased the day after the lithium-pilocarpine-induced SE and increased at 14 days, when compared with levels after sham treatment. The increase in serum S100-B levels suggests astroglial activation and long-term changes in BBB.

S100-B is a potential biomarker for SE: it is expressed in brain and CSF, can be released in the blood in case of BBB

alterations like in SE, and is increased in a rat model of SE and in patients with seizures. Nevertheless, it still has to be evaluated in patients with SE.

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a CNS-specific intermediate filament that is expressed exclusively in astrocytes located in the white matter. In the CNS, GFAP is of paramount importance for the structural organization of astrocytes, the communication between astrocytes and some neurons types, including Purkinje cells, and in maintaining the integrity of the BBB.

Elevated CSF GFAP levels were shown in children with seizures as compared with controls.⁴⁹ In addition, seizure duration was positively correlated with CSF GFAP levels along with SE severity. On the other hand, the etiologies of the seizures did not seem to affect GFAP level. To the best of our knowledge, no other study in children or adults was conducted. In blood, GFAP might be a better biomarker of SE than S100-B because extracerebral production of GFAP was never detected. Immunohistochemistry studies in animal models of SE have shown increased progress of GFAP staining after SE in hippocampus, substantia nigra, and cortical areas.⁵⁰

To conclude, based on the available studies conducted in animal models of SE and in patients with epilepsy, S100-B and GFAP have the potential to be relevant biomarkers of SE due to their expression in brain and CSF, their ability to be released in the blood, and their increase after SE. Nevertheless, additional studies on a large cohort of patients with SE with longitudinal follow-up are necessary to better evaluate the capacity of these biomarkers to identify patients with SE and to predict their clinical outcome.

9 | NEUROINFLAMMATION

There is increasing evidence for the role of brain inflammation in epilepsy. Glial cell activation secondary to the BBB breakdown or neuronal death can induce neuroinflammation and can be followed by the increase of cytokines/chemokines in CSF and in the blood of patients with SE. Cytokines such as IL-1 β , IL-6, CRP, and the High Mobility Group Box 1 (or HMGB1) were measured to investigate their potential biomarker interest in epilepsy.

High Mobility Group Box 1 fulfills many criteria for a good fluid biomarker, including good stability in blood. Higher HMGB1 staining was found in mice astrocytes after intrahippocampal injection of kainic acid and in humans epileptic tissues obtained from hippocampal sclerosis surgery.⁵¹ In addition, antagonists of HMGB1 increase delay before the first spontaneous seizure and decrease seizure recurrence.⁵¹ It has to be evaluated in human body fluids too.

Conflicting results were observed for IL-1 β . IL-1 receptor (IL-1R) and its ligand, the proinflammatory cytokine IL-1 β , are

often expressed in association with BBB breakdown and neuronal damage, suggesting a key role for the BBB in the brain inflammation observed in both mice and humans with epilepsy.²⁵ An increase of IL-1ra, the interleukin-1 receptor antagonist, and a decrease of IL-1 β levels were reported in the CSF of eight patients after prolonged focal or recurrent tonic-clonic seizures in comparison to 16 control subjects.⁵² Increased⁵³ or decreased blood IL-1ra levels were also reported in patients after seizures.⁵⁴ Furthermore, a study conducted in 85 children with generalized tonic-clonic seizures reported a positive correlation between IL-1 β and NSE levels in CSF.⁵⁵ To the best of our knowledge, no other study evaluated IL-1 β as a biomarker in SE patients.

In an animal model of SE, an induction of IL-1R and IL-1 β was shown in brain cells following SE.^{56,57} For instance, a rapid and persistent increase of IL-1 β messenger RNA (mRNA) was observed in the hippocampus of a rat model of SE. IL-1 β is a less stable molecule explaining why time that elapses between the seizure occurrence and the samples could play a major role in the variable results described so far.

IL-6 seems to be a good fluid biomarker, showing an increase of blood levels described in all studies conducted in patients with epilepsy and in animal models of SE.^{53,58} Increased CSF IL-6 was also observed after recurrent generalized tonic-clonic seizures in patients.⁵⁸ However, there is a lack of studies conducted in patients regarding the cytokine levels in blood or CSF during SE.

An acute inflammatory response occurs within the SE. Nevertheless, to the best of our knowledge, the disturbances in cytokine levels and the correlation between the blood cytokines or HMGB1 levels and patients' outcomes after SE were not investigated.

10 | ACUTE AXONAL INJURY

The two best-established CSF biomarkers of axonal injury are tau protein, a phosphorylated microtubule-associated protein, and neurofilament light polypeptide (NFL).

Only few studies evaluated the potential of tau protein as a prognosis biomarker of seizure-related neuronal damage.⁵⁹ CSF levels of tau protein were evaluated in patients with SE and correlated with prognosis.⁶⁰ Of 28 patients with SE without acute brain injury, CNS infection, or neurodegenerative disorders, CSF tau levels were increased in 14 patients. In addition, higher CSF tau levels were measured in patients who developed a refractory SE compared to patients with SE controlled by antiepileptic drugs. Moreover, CSF tau levels were positively correlated with SE duration and a higher risk of sequels and subsequent epilepsy. Nevertheless, CSF tau levels were significantly higher in patients who were treated by propofol, which is known to induce tau phosphorylation.⁶¹ The marked increase of tau protein in refractory and superrefractory SE cases, and the capacity of tau protein to prospectively

identify patients with status severity, development of disability, and subsequent epilepsy deserve future verifications.

Neurofilaments are composed of neuron-specific intermediate filaments. Each filament consists of one light subunit (NFL) and a medium subunit (NFM) or a heavy subunit (NFH). High levels of NFH were noted in patients with SE and repetitive generalized tonic-clonic seizures in comparison to control subjects.⁶² However, no study correlated NFH levels with the clinical outcome of patients.

11 | NEUROGENESIS

Fluid biomarkers may reflect the SE severity as well as neuroprotective mechanisms resulting from the brain adaptation to excitotoxicity. Nevertheless, the current knowledge about neuroprotective mechanisms in humans after SE is scarce. PGRN is responsible for neurite outgrowth and limits exceeding neuroinflammatory responses. Growing evidence suggests a role for PGRN in the lysosome.

In patients, increased levels of PGRN were measured in the CSF after SE and after a single tonic-clonic seizure, but no significant difference was observed between the two groups.²⁴ No correlation between PGRN levels and the time of SE was found. In addition, higher CSF PGRN levels had no impact on clinical outcome. Nevertheless, the cohort was heterogeneous and not fully sufficient. A larger cohort with more homogenous patient is needed to further investigate the relationship between SE and PGRN.

The role of PGRN was investigated in rats after pilocarpine-induced SE.⁶³ An increase of mRNA and the protein is reported in the cortex and hippocampus. The increase of PGRN was delayed and peaked 48-96 hours after the SE onset. PGRN elevation occurs primarily in activated microglia, which could explain the elevation delay. Raising cerebral PGRN levels may contribute to neuroprotection by activating the endolysosomal system and facilitating regeneration. PGRN could therefore be a potential new therapeutic strategy in SE.

Neurotrophic factors, involved in the survival of neurons as well as in the proliferation and differentiation of neuronal precursors, could be useful as prognosis biomarkers in SE. An up-regulation of neurotrophic factors after SE is seen as reflecting a potential neuroprotective role.⁶⁴ Moreover, it was shown that FGF-2/BDNF-expressing vectors in pilocarpine model of SE were associated with an increased neurogenesis, limited neuronal damage, and reduced occurrence of spontaneous seizures.⁶⁵

12 | OTHER POTENTIAL BIOMARKERS

This review reports a number of potential protein biomarkers in CSF and blood that were reported in SE. Since a few years,

other types of fluid biomarkers such as lipids or microRNAs biomarkers are studied.

CSF microRNAs are promising biomarkers of temporal lobe epilepsy and SE; 20 microRNAs showed differential expression between patients in SE and controls patients.⁶⁶ Targets of these microRNAs include proteins regulating neuronal death, neuroinflammation, or gliosis; such mechanisms are involved in the late consequences of SE. Therefore, this new approach can be used to distinguish SE from other neurologic diseases.

Lipids could provide a new source of biomarkers in SE as well. Indeed, disturbances in brain cholesterol homeostasis were reported in neurologic disorders where excitotoxicity plays an important role.⁶⁷ Moreover, the accumulation of intracerebral cholesterol is associated with neuronal loss and epileptic abnormalities.⁵⁰ The availability of lipid biomarkers measurable at the level of the brain as well as in the serum or the CSF may represent new tools for prospective prognosis studies. Endogenous neurosteroids were studied in SE. They can modulate the excitability of neurons through the effects on the γ -aminobutyric acid A (GABA_A) receptor chloride channel complex. Two recent studies reported low levels of neurosteroids (ie, allopregnanolone and progesterone) in the CSF of SE patients, suggesting their possible use as a novel therapeutic agent.^{68,69} The first-in-man allopregnanolone use in adult super-refractory SE provided proof of principle to support its clinical development as a novel therapeutic agent.⁷⁰ Nevertheless, a phase 2 trial failed to demonstrate efficacy.⁷¹

Some biomarkers are more specific to one clinical subtype of SE or etiology. Therefore, it could be useful to determine specific biomarkers of new-onset refractory status epilepticus (NORSE), the most severe form of SE.

13 | CONCLUSION

A large number of biomarkers related to SE reflecting injury of different cell types or structures within the CNS can be measured in CSF and blood. This review summarizes the findings of animal and human studies, which were conducted to identify diagnosis and prognosis biomarkers of SE.

Diagnosis of convulsive SE relies mainly on clinical assessment. On the other hand, the diagnosis of nonconvulsive SE relies on EEG recording. In this condition, non-EEG biomarkers, like neuronal or axonal injury proteins, could be of interest for the diagnosis and management of nonconvulsive SE.

Biomarkers could also be useful to identify the etiology of SE. Increased NSE levels are more associated with clinical SE subtypes than with SE etiology. On the other hand, early increase of cytokines levels, such as IL-1 β , IL-6, or S100-B, should be more frequently associated with infectious or

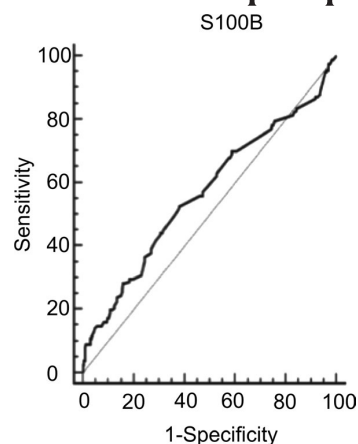


FIGURE 4 Example of a receiver operating characteristic curve for S100-B. Reprinted from *Predictive Value of S100-B and Copeptin for Outcomes following Seizure: the BISTRO International Cohort Study* (p.8), Yonathan Freund, 2015, PLOS One.⁴⁷ This study evaluated the performance of S100-B in addition to clinical variables in predicting the outcomes of patients following seizure. A receiver operating characteristic curve was constructed. It could be used to appraise the value of a biomarker by calculating the area under the curve and to identify thresholds using Youden's method. A sensitivity of 0.57 and a specificity of 0.53 for S100-B were defined. The best biomarker would have simultaneously a sensitivity around 100% and a score "1-specificity" around zero

autoimmune SE. These biomarkers could guide the initiation of specific treatment.

Outcome scores based on demographic, clinical, and EEG condition are already available. However, they mostly predict the mortality, whereas the severity of brain injury in survivors is poorly understood. The highest levels of NSE, tau protein, and GFAP were correlated with the worst outcome. Elevated levels of serum NSE after generalized tonic-clonic seizures and SE could be due primarily to an increased diffusion of NSE across a more permeable BBB, causing a transfer from the brain compartment to the serum compartment. Serum NSE might also be a relevant biomarker of seizures, independent of neuronal death. Otherwise, this explanation would not account for the increase of NSE in the CSF.

Further studies with longitudinal follow-up of these biomarkers and clinical data are needed to evaluate their prognostic value, in particular their ability to prospectively identify patients developing subsequent epilepsy or to prognose the cognitive outcomes.

To the best of our knowledge, no biomarker described in this review is disease-specific. Protein biomarkers were also reported in mild traumatic brain injury (acidosis, NSE, S100-B, cytokines, albumin, CSF/serum ratio), in stroke (NSE, S100-B, cytokines, PGRN), and in infection for cytokines.^{8,72,73} A good fluid biomarker is a molecule

whose measurement in fluid provides highly sensitive and specific results. A compromise should be defined between the performance of specificity and sensitivity. This could be represented in receiver-operating characteristic (ROC) curves to appraise the value of the biomarker and to identify the thresholds (Figure 4, according to Freund et al⁴⁷). No study of biomarkers in SE reported ROC curves in order to identify their performance. Moreover, among the reports of biomarkers of interest, only one was conducted in accordance with guidelines to uniformly report studies of body fluid biomarker in neurologic disorders.⁷⁴ Nevertheless, this study aimed to establish the incremental prognostic value of S100-B after seizures, and so did not concern SE.⁴⁷ According to the Simon's classification, other studies had also the lowest levels of evidence that might be used to determine the clinical utility of a biomarker due to an inappropriate design.⁷⁵ We therefore cannot rank the different biomarkers in terms of performance. More studies following these guidelines are needed to validate their clinical potential. We also recommend conducting separate studies with a specific design to evaluate biomarkers for SE diagnosis, for specific etiology, or for prognosis.

A good fluid biomarker is a molecule whose biochemical assessment is easy, quick, and reliable, and which is stable in the body fluids. We can appraise these different biomarkers on the practicality of measuring. First, we can range biomarkers described above in three categories according to the mean duration of biochemical assessment: hours for acidosis biomarkers, S100-B and NSE; days for albumin ratio and cytokines levels; and up to several weeks for PGRN and tau proteins. Second, the reliability of the biochemical assessment should be taken into account. Data may be more reliable with an automatic method, used in the measurement of S100-B and NSE levels, compared with manual methods, used for the evaluation of PGRN or tau levels. Nevertheless, NSE is highly sensitive to hemolysis and an adapted preanalytic approach is needed for good monitoring. Third, some biomarkers are less stable in body fluids. For example, IL-1 β is a less stable molecule when compared with IL-6, and S100-B protein has a shorter half-life compared with NSE, explaining why time that elapses between the seizure occurrence and the samples could induce variable results. Based on their physical and biochemical characteristics, NSE seems to be the best valuable biomarker.

Identification of suitable biomarkers could help clinicians establish a more accurate diagnosis, in particular for the non-convulsive type of SE; to identify SE etiology; to predict clinical outcome; and to manage the treatments. Biomarkers would be combined with clinical and paraclinical data (EEG and MRI) for an overall view of a patient admitted to an intensive care unit with SE.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Stephen Withmarsh and Mark Williams (Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Université, F-75013, Paris, France) for critical reading of the manuscript.

This work received support from the “Investissements d'avenir” program ANR-10-IAIHU-06, from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FDM20170839111), and from the Fondation pour la Recherche de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (EPIRES- Marie-Laure PLV Merchandising).

CONFLICT OF INTERESTS

V.N. reports personal fees from UCB, LivaNova, and EISAI, outside the submitted work. The other authors report no disclosures. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

ORCID

Vincent Navarro  <https://orcid.org/0000-0003-0077-8114>

REFERENCES

1. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*. 2017;88:296–303.
2. Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, et al. A definition and classification of status epilepticus—Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*. 2015;56:1515–23.
3. Rossetti AO, Lowenstein DH. Management of refractory status epilepticus in adults: still more questions than answers. *Lancet Neurol*. 2011;10:922–30.
4. Rossetti AO, Logroscino G, Bromfield EB. A clinical score for prognosis of status epilepticus in adults. *Neurology*. 2006;66:1736–8.
5. Leitinger M, Trinka E, Giovannini G, Zimmermann G, Florea C, Rohrer A, et al. Epidemiology of status epilepticus in adults: a population-based study on incidence, causes, and outcomes. *Epilepsia*. 2019;60:53–62.
6. Meletti S, Giovannini G, d'Orsi G, Toran L, Monti G, Guha R, et al. New-onset refractory status epilepticus with claustrum damage: definition of the clinical and neuroimaging features. *Front Neurol*. 2017;8:111.
7. Tschampa HJ, Greschus S, Sassen R, Bien CG, Urbach H. Thalamus lesions in chronic and acute seizure disorders. *Neuroradiology*. 2011;53:245–54.
8. Zetterberg H, Smith DH, Blennow K. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat Rev Neurol*. 2013;9:201–10.
9. Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2010;6:131–44.
10. Hall S, Surova Y, Öhrfelt A, Zetterberg H, Lindqvist D, Hansson O. CSF biomarkers and clinical progression of Parkinson disease. *Neurology*. 2015;84:57–63.

11. Link H, Huang Y-M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol.* 2006;180:17–28.
12. Trinka E, Kälviäinen R. 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. *Seizure.* 2017;44:65–73.
13. Ciurans J, Grau-López L, Jiménez M, Fumana A, Misis M, Becerra JL. Refractory status epilepticus: Impact of baseline comorbidity and usefulness of STESS and EMSE scoring systems in predicting mortality and functional outcome. *Seizure.* 2018;56:98–103.
14. Alvarez V, Westover MB, Drislane FW, Dworetzky BA, Curley D, Lee JW, et al. Evaluation of a clinical tool for early etiology identification in status epilepticus. *Epilepsia.* 2014;55:2059–68.
15. Jun JS, Lee ST, Kim R, Chu K, Lee SK. Tocilizumab treatment for new onset refractory status epilepticus. *Ann Neurol.* 2018;84:940–5.
16. Meldrum BS, Horton RW. Physiology of status epilepticus in primates. *Arch Neurol.* 1973;28:1–9.
17. Huang CW, Cheng JT, Tsai JJ, Wu SN, Huang CC. Diabetic hyperglycemia aggravates seizures and status epilepticus-induced hippocampal damage. *Neurotox Res.* 2009;15:71–81.
18. Sutter R, Dittrich T, Semmlack S, Rüegg S, Marsch S, Kaplan PW. Acute systemic complications of convulsive status epilepticus—a systematic review. *Crit Care Med.* 2018;46:138–45.
19. Jutila L, Immonen A, Partanen K, Partanen J, Mervaala E, Ylinen A, et al. Neurobiology of epileptogenesis in the temporal lobe. *Adv Tech Stand Neurosurg.* 2002;27:5–22.
20. Brandt C, Gastens AM, Mz S, Hausknecht M, Löscher W. Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats. *Neuropharmacology.* 2006;51:789–804.
21. Sankar R, Shin DH, Wasterlain CG. Serum neuron-specific enolase is a marker for neuronal damage following status epilepticus in the rat. *Epilepsy Res.* 1997;28:129–36.
22. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1997;17:3727–38.
23. Jakubs K, Nanobashvili A, Bonde S, Ekdahl CT, Kokaia Z, Kokaia M, et al. Environment matters: synaptic properties of neurons born in the epileptic adult brain develop to reduce excitability. *Neuron.* 2006;52:1047–59.
24. Huchtemann T, Körtvélyessy P, Feistner H, Heinze HJ, Bittner D. Progranulin levels in status epilepticus as a marker of neuronal recovery and neuroprotection. *Epilepsy Behav.* 2015;49:170–2.
25. Ravizza T, Gagliardi B, Noé F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2008;29:142–60.
26. Vezzani A, Baram TZ. New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Curr.* 2007;7:45–50.
27. Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E. Status epilepticus, blood–brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. *Epilepsy Behav.* 2015;49:13–6.
28. Calabrese VP, Gruemer HD, James K, Hranowsky N, DeLorenzo RJ. Cerebrospinal fluid lactate levels and prognosis in status epilepticus. *Epilepsia.* 1991;32:816–21.
29. Chatzikonstantinou A, Ebert AD, Hennerici MG. Cerebrospinal fluid findings after epileptic seizures. *Epileptic Disord.* 2015;17:453–9.
30. Sokrab TE, Kalimo H, Johansson BB. Endogenous serum albumin content in brain after short-lasting epileptic seizures. *Brain Res.* 1989;489:231–6.
31. Royds JA, Davies-Jones GA, Lewtas NA, Timperley WR, Taylor CB. Enolase isoenzymes in the cerebrospinal fluid of patients with diseases of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1983;46:1031–6.
32. Rabinowicz AL, Correale J, Boutros RB, Couldwell WT, Henderson CW, DeGiorgio CM. Neuron-specific enolase is increased after single seizures during inpatient video/EEG monitoring. *Epilepsia.* 1996;37:122–5.
33. Suzuki Y, Toribe Y, Goto M, Kato T, Futagi Y. Serum and CSF neuron-specific enolase in patients with West syndrome. *Neurology.* 1999;53:1761–4.
34. Tanabe T, Suzuki S, Hara K, Shimakawa S, Wakamiya E, Tamai H. Cerebrospinal fluid and serum neuron-specific enolase levels after febrile seizures. *Epilepsia.* 2001;42:504–7.
35. Correale J, Rabinowicz AL, Heck CN, Smith TD, Loskota WJ, DeGiorgio CM. Status epilepticus increases CSF levels of neuron-specific enolase and alters the blood-brain barrier. *Neurology.* 1998;50:1388–91.
36. DeGiorgio CM, Correale JD, Gott PS, Ginsburg DL, Bracht KA, Smith T, et al. Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology.* 1995;45:1134–7.
37. DeGiorgio CM, Heck CN, Rabinowicz AL, Gott PS, Smith T, Correale J. Serum neuron-specific enolase in the major subtypes of status epilepticus. *Neurology.* 1999;52:746–9.
38. Maiti R, Mishra BR, Sanyal S, Mohapatra D, Parida S, Mishra A. Effect of carbamazepine and oxcarbazepine on serum neuron-specific enolase in focal seizures: A randomized controlled trial. *Epilepsy Res.* 2017;138:5–10.
39. Ramont L, Thoannes H, Volondat A, Chastang F, Millet MC, Maquart FX. Effects of hemolysis and storage condition on neuron-specific enolase (NSE) in cerebrospinal fluid and serum: implications in clinical practice. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:1215–7.
40. van Vliet EA, da Costa AS, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain J Neurol.* 2007;130:521–34.
41. Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest.* 1977;37:385–90.
42. Li YJ, Wang ZH, Zhang B, Zhe X, Wang MJ, Shi ST, et al. Disruption of the blood-brain barrier after generalized tonic-clonic seizures correlates with cerebrospinal fluid MMP-9 levels. *J Neuroinflammation.* 2013;10:80.
43. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:637–68.
44. Sen J, Belli A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J Neurosci Res.* 2007;85:1373–80.
45. Beaudeau J-L, Laribi S. S100B protein serum level as a biomarker of minor head injury. *Ann Biol Clin (Paris).* 2013;71:71–8.
46. Rezaei O, Pakdaman H, Gharehgozli K, Simani L, Vahedian-Azimi A, Asaadi S, et al. S100 B: A new concept in neurocritical care. *Iran J Neurol.* 2017;16:83–9.
47. Freund Y, Bloom B, Bokobza J, Baarir N, Laribi S, Harris T, et al. Predictive value of S100-B and copeptin for outcomes

- following seizure: the BISTRO International Cohort Study. *PLoS One*. 2015;10:e0122405.
48. Vizuete AFK, Hennemann MM, Gonçalves CA, de Oliveira DL. Phase-dependent astroglial alterations in Li-Pilocarpine-induced status epilepticus in young rats. *Neurochem Res*. 2017;42:2730–42.
 49. Gurnett CA, Landt M, Wong M. Analysis of cerebrospinal fluid glial fibrillary acidic protein after seizures in children. *Epilepsia*. 2003;44:1455–8.
 50. Chali F, Djelti F, Eugene E, Valderrama M, Marquer C, Aubourg P, et al. Inhibiting cholesterol degradation induces neuronal sclerosis and epileptic activity in mouse hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2015;41:1345–55.
 51. Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, Iyer AM, et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med*. 2010;16:413–9.
 52. Lehtimäki KA, Keränen T, Palmio J, Peltola J. Levels of IL-1-beta; and IL-1ra in cerebrospinal fluid of human patients after single and prolonged seizures. *NeuroImmunoModulation*. 2010;17:19–22.
 53. Lehtimäki KA, Keränen T, Palmio J, Mäkinen R, Hurme M, Honkaniemi J, et al. Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy. *Acta Neurol Scand*. 2007;116:226–30.
 54. Alapirtti T, Rinta S, Hulkkonen J, Mäkinen R, Keränen T, Peltola J. Interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta production in patients with focal epilepsy: a video-EEG study. *J Neurol Sci*. 2009;280:94–7.
 55. Shi LM, Chen RJ, Zhang H, Jiang CM, Gong J. Cerebrospinal fluid neuron specific enolase, interleukin-1 β and erythropoietin concentrations in children after seizures. *Childs Nerv Syst*. 2017;33:805–11.
 56. Lehtimäki KA, Peltola J, Koskikallio E, Keränen T, Honkaniemi J. Expression of cytokines and cytokine receptors in the rat brain after kainic acid-induced seizures. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;110:253–60.
 57. Vezzani A, Conti M, De Luigi A, Ravizza T, Moneta D, Marchesi F, et al. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci*. 1999;19:5054–65.
 58. Lehtimäki KA, Keränen T, Huhtala H, Hurme M, Ollikainen J, Honkaniemi J, et al. Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid and serum compartments by seizures: the effect of seizure type and duration. *J Neuroimmunol*. 2004;152:121–5.
 59. Palmio J, Suhonen J, Keränen T, Hulkkonen J, Peltola J, Pirttilä T. Cerebrospinal fluid tau as a marker of neuronal damage after epileptic seizure. *Seizure*. 2009;18:474–7.
 60. Monti G, Tondelli M, Giovannini G, Bedin R, Nichelli PF, Trenti T, et al. Cerebrospinal fluid tau proteins in status epilepticus. *Epilepsy Behav*. 2015;49:150–4.
 61. Whittington RA, Bretteville A, Virág L, Emala CW, Maurin TO, Marcouiller F, et al. Anesthesia-induced hypothermia mediates decreased ARC gene and protein expression through ERK/MAPK inactivation. *Sci Rep*. 2013;3:1388.
 62. Rejdak K, Kuhle J, Rüegg S, Lindberg RL, Petzold A, Sulejczak D, et al. Neurofilament heavy chain and heat shock protein 70 as markers of seizure-related brain injury. *Epilepsia*. 2012;53:922–7.
 63. Zhu S, Tai C, Petkau TL, Zhang S, Liao C, Dong Z, et al. Progranulin promotes activation of microglia/macrophage after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res*. 2013;1530:54–65.
 64. Lenzer-Fanara JR, Li T, Salerni EA, Payen F, Croll SD. VEGF treatment during status epilepticus attenuates long-term seizure-associated alterations in astrocyte morphology. *Epilepsy Behav*. 2017;70:33–44.
 65. Simonato M, Zucchini S. Are the neurotrophic factors a suitable therapeutic target for the prevention of epileptogenesis? *Epilepsia*. 2010;51:48–51.
 66. Raoof R, Jimenez-Mateos EM, Bauer S, Tackenberg B, Rosenow F, Lang J, et al. Cerebrospinal fluid microRNAs are potential biomarkers of temporal lobe epilepsy and status epilepticus. *Sci Rep*. 2017;7:3328.
 67. Valenza M, Cattaneo E. Cholesterol dysfunction in neurodegenerative diseases: is Huntington's disease in the list? *Prog Neurobiol*. 2006;80:165–76.
 68. Meletti S, Lucchi C, Monti G, Giovannini G, Bedin R, Trenti T, et al. Decreased allopregnanolone levels in cerebrospinal fluid obtained during status epilepticus. *Epilepsia*. 2017;58:e16–20.
 69. Meletti S, Lucchi C, Monti G, Giovannini G, Bedin R, Trenti T, et al. Low levels of progesterone and derivatives in cerebrospinal fluid of patients affected by status epilepticus. *J Neurochem*. 2018;147:275–84.
 70. Vaitkevicius H, Husain AM, Rosenthal ES, Rosand J, Bobb W, Reddy K, et al. First-in-man allopregnanolone use in super-refractory status epilepticus. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017;4:411–4.
 71. Rosenthal ES, Claassen J, Wainwright MS, Husain AM, Vaitkevicius H, Raines S, et al. Brexanolone as adjunctive therapy in super-refractory status epilepticus. *Ann Neurol*. 2017;82:342–52.
 72. Ng GJL, Quek AML, Cheung C, Arumugam TV, Seet RCS. Stroke biomarkers in clinical practice: a critical appraisal. *Neurochem Int*. 2017;107:11–22.
 73. van Engelen TSR, Wiersinga WJ, Scicluna BP, van der Poll T. Biomarkers in sepsis. *Crit Care Clin*. 2018;34:139–52.
 74. Gnanapavan S, Hegen H, Khalil M, Hemmer B, Franciotta D, Hughes S, et al. Guidelines for uniform reporting of body fluid biomarker studies in neurologic disorders. *Neurology*. 2014;83:1210–6.
 75. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:1446–52.

How to cite this article: Hanin A, Lambrecq V, Denis JA, et al. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus. *Epilepsia*. 2020;61:6–18. <https://doi.org/10.1111/epi.16405>

Partie 3. Le métabolisme du cholestérol : une nouvelle piste de biomarqueurs pour les états de mal épileptiques

1. Le métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est un composant essentiel des membranes cellulaires et représente entre 10 et 45% des lipides membranaires (Korinek et al. 2015). Au sein de la membrane, le cholestérol n'est pas réparti de façon homogène mais se concentre au niveau de microdomaines rigides nommés « radeaux lipidiques » ou « *lipid rafts* » (Hering et al. 2003). Le cholestérol et les sphingolipides incorporés dans ces radeaux lipidiques ont un rôle clé dans la signalisation cellulaire, la fluidité membranaire et l'endocytose (Simons and Toomre 2000; Nichols and Lippincott-Schwartz 2001). Le cholestérol est également indispensable pour la synthèse des hormones stéroïdiennes et des acides biliaires.

1.1. Homéostasie du cholestérol

*** Synthèse et apport exogène**

Il existe deux grandes voies d'apport de lipides dans l'organisme : un apport alimentaire (voie exogène) et une synthèse hépatique (voie endogène) (Leoni and Caccia 2013).

L'alimentation apporte environ 100 grammes par jour de triglycérides et 0,3 à 0,5 grammes par jour de cholestérol. Les lipides provenant de l'alimentation sont transportés sous la forme de chylomicrons. Les chylomicrons rejoignent la circulation sanguine et subissent rapidement une hydrolyse de leurs triglycérides par les lipoprotéines lipases (LPL) synthétisées par les tissus adipeux et musculaire (Beaudeau 2011).

La synthèse du cholestérol au niveau hépatique est complexe et fait intervenir une vingtaine de réactions enzymatiques (Figure 18). La conversion du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoenzymeA (HMG-CoA) en acide mévalonique représente l'étape limitante de la synthèse du cholestérol. Cette conversion est contrôlée par l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoenzymeA réductase ou HMG-CoA réductase. Cette enzyme est présente au niveau du réticulum endoplasmique et son activité est régulée par le cholestérol *via* les *Sterols Regulatory Element Binding Protein* (SREBP) ou par des agents pharmacologiques tels que les statines (Horton et al. 2002).

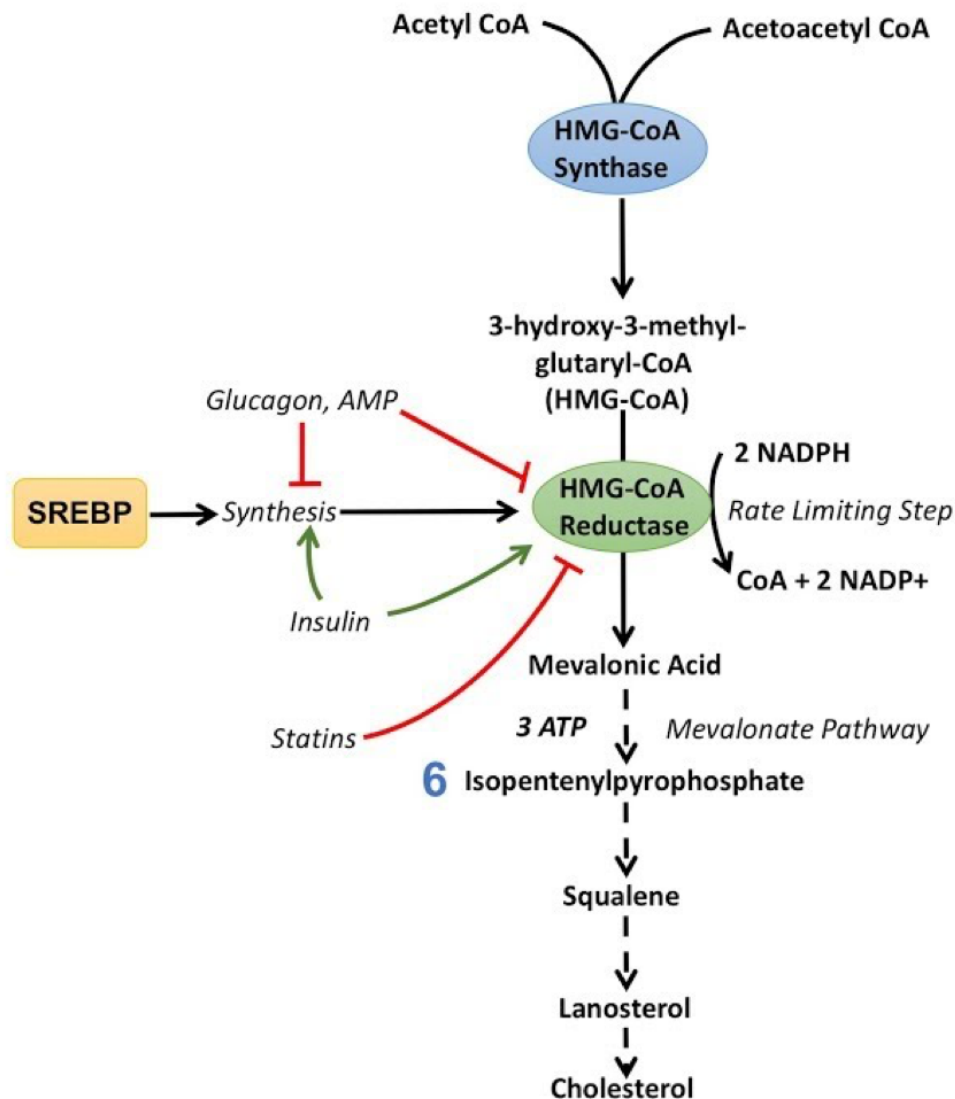


Figure 18 : Voies de synthèse du cholestérol et régulation par les SREBP et les statines.

Les SREBP forment une famille de facteurs de transcription qui comprend trois membres : SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2. Ils activent l'expression d'une trentaine de gènes dédiés à la synthèse et la recapture du cholestérol, dont la HMG-CoA-réductase et la squalène synthase (Horton and Shimomura 1999; Sakakura et al. 2001). Ces protéines sont présentes sous forme inactive, à l'état basal, dans le réticulum endoplasmique et s'organisent en trois parties : (i) un domaine NH₂-terminal qui contient la région bHLH-Zip pour la liaison à l'ADN, (ii) deux domaines transmembranaires et (iii) un domaine COOH-terminal qui interagit avec la protéine SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) (Horton et al. 2002).

Lorsque la concentration en cholestérol décroît, la protéine SCAP induit le passage des SREBP du réticulum endoplasmique vers le compartiment golgien, où les SREBP sont clivées successivement par deux protéases transmembranaires, S1P et S2P (Figure 19). La protéase S1P sépare les deux domaines transmembranaires, puis la protéase S2P sépare le domaine transmembranaire de l'extrémité N-terminale, libérant ainsi la forme active mature des SREBP. Le domaine NH₂-terminal s'homodimérise grâce à la présence du motif *helix-loop-helix* puis migre jusqu'au noyau pour se lier aux séquences cis-régulatrices SRE (*Sterol Response Elements*) et activer l'expression de nombreux gènes nécessaires à la synthèse du cholestérol et des acides gras (Figure 19). Selon la SREBP activée, une synthèse accrue de cholestérol ou d'acides gras est induite : la SREBP-2 stimule la synthèse du cholestérol ; la SREBP-1c favorise la synthèse des acides gras et la SREBP-1a a un profil ubiquitaire et stimule la synthèse du cholestérol et des acides gras (Horton et al. 2002).

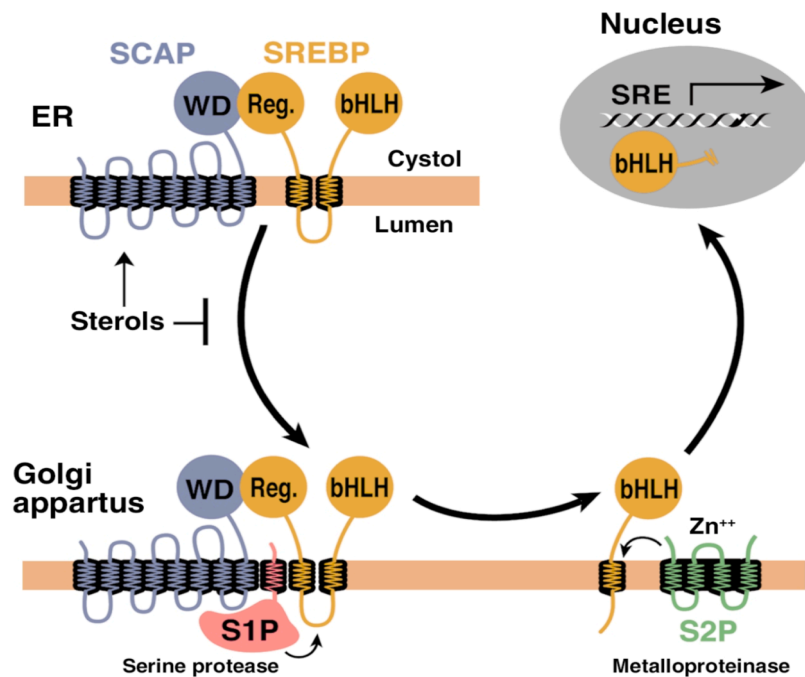


Figure 19 : Régulation de la localisation et de l'activité des SREBP par la protéine SCAP et les protéases S1P et S2P.

Horton et al. *The Journal of Clinical Investigation* 2002.

Lorsque la concentration en cholestérol augmente, le complexe SREBP/SCAP n'est plus incorporé dans des vésicules de transport et les SREBP ne rejoignent pas le compartiment golgien (Horton et al. 2002).

Ces protéines font par ailleurs l'objet de régulations fines par l'insuline et le glucagon : tandis que l'insuline favorise l'activation de la SREBP-1c et en conséquence la synthèse d'acides gras, le glucagon inhibe la SREBP-1c et s'oppose ainsi à la synthèse d'acides gras (Shimomura et al. 1999).

*** Transport et stockage**

Les lipides sont insolubles en milieu aqueux. En conséquence, les lipides sont transportés dans le sang sous la forme d'une association lipido-protéique soluble, nommée lipoprotéine. Les lipoprotéines ont une structure sphérique dans laquelle le noyau ou « core lipidique » comprend les lipides apolaires (triglycérides et cholestérol estérifié) et où l'on trouve, en périphérie, une enveloppe polaire constituée de phospholipides, de cholestérol non estérifié (ou cholestérol libre) et d'apolipoprotéines (Figure 20) (Beaudeau 2011).

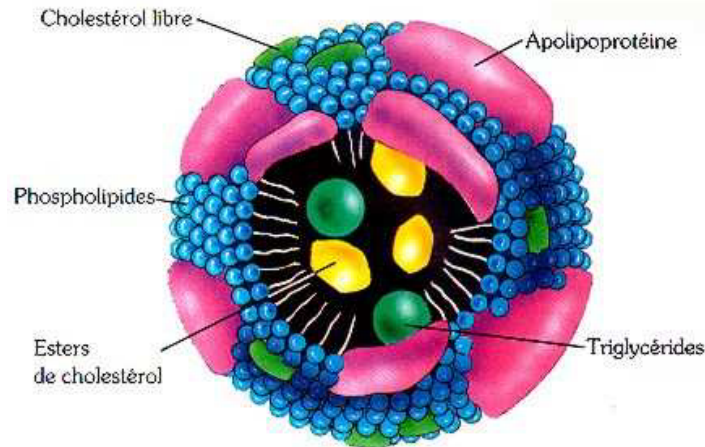


Figure 20 : Schéma d'une lipoprotéine.

Tous les constituants lipidiques sont présents dans les différentes lipoprotéines mais en des proportions variables (Tableau 11).

Lipoprotéine	Cholestérol estérifié (%)	Cholestérol libre (%)	Triglycérides (%)	Phospholipides (%)	Protéines (%)	Apolipoprotéines majeures
Chylomicrons	2-4	1-3	80-95	3-6	1-2	B-48
VLDL	15	5	50-60	15-20	10	B-100, CII, E
LDL	37	8	10	22	25	B-100
HDL	14	3	8	22	45-55	A-1, A-II

Tableau 11 : Composition des principales lipoprotéines.
Beaudeau et al. *Biochimie médicale*. 2011

Le foie synthétise en majorité les lipoprotéines VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), riches en triglycérides. Ces lipoprotéines subissent une hydrolyse de leurs triglycérides par les LPL (lipoprotéines lipases) au niveau vasculaire pour former les IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*). Une seconde lipase, nommée TGLH (*Triglycérides Lipase Hépatique*) hydrolyse les triglycérides des IDL au niveau hépatique pour former les LDL (*Low Density Lipoprotein*).

Les LDL permettent le transport du cholestérol du compartiment hépatique vers les tissus périphériques (Figure 21). Les LDL sont reconnues au niveau des cellules périphériques par leur apolipoprotéine B qui se fixe aux récepteurs membranaires LDL-récepteurs, également appelées récepteurs B/E. Les LDL sont endocytées, avec leurs récepteurs, dans des puits de clathrine puis dégradées en l'ensemble de leurs constituants lipidiques. Cette dernière étape permet notamment la libération et le stockage du cholestérol libre au niveau des tissus périphériques (Beaudeau 2011).

La synthèse des LDL et du cholestérol au niveau hépatique fait l'objet d'un contrôle strict de la part du cholestérol intracellulaire. Si la concentration en cholestérol augmente, alors un rétrocontrôle négatif se met en place entraînant une diminution de la synthèse de cholestérol hépatique et de la synthèse des LDL-récepteurs. Le cholestérol libre, présent en excès, est estérifié sous l'action de l'enzyme ACAT (Acyl-Coenzyme A-Cholestérol-Acyl-Transférase).

* Élimination

Sous l'influence de la LCAT (Lécithine Cholestérol Acyltransférase), les esters de cholestérol transforment les pré β -HDL (*High Density Lipoprotein*) discoïdales en HDL sphériques matures qui ont la capacité de retourner au foie, où le cholestérol peut être dégradé en acides biliaires (Figure 21).

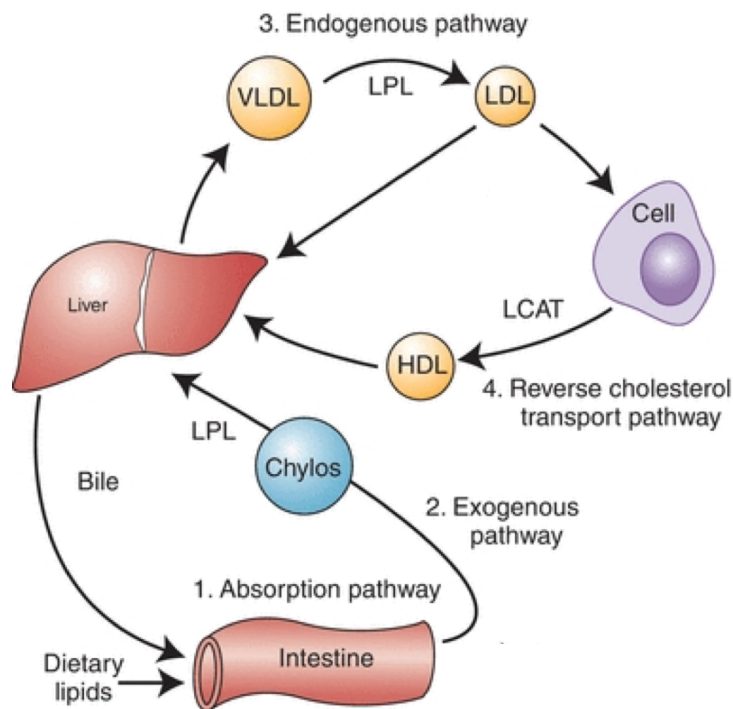


Figure 21 : Métabolisme des lipoprotéines.
Adapté de *Basicmedical Key* « lipids and lipoproteins » 2017

1.2. Spécificité du cholestérol intracérébral

Bien que le cerveau représente moins de 5% de la masse corporelle totale, il contient près de 25% du cholestérol de l'organisme. Le cholestérol intracérébral joue un rôle clé dans le développement cérébral, la synaptogénèse et l'activité neuronale, en inhibant ou en activant certains canaux ioniques dépendant du voltage (Björkhem and Meaney 2004; Dietschy and Turley 2004; Levitan et al. 2014; Korinek et al. 2015).

* Synthèse

La synthèse du cholestérol intracérébral s'effectue *in situ*, principalement par les cellules gliales. Tout comme au niveau hépatique, la synthèse du cholestérol intracérébral nécessite une vingtaine de réactions enzymatiques (Mitsche et al. 2015). On distingue deux grandes voies de synthèse, le « Bloch pathway » et le « Kandutsch-Russel pathway » (Mitsche et al. 2015; Zhang and Liu 2015). Ces deux voies possèdent le lanostérol comme précurseur commun ; le « Bloch pathway » permet la synthèse du desmostérol, tandis que le « Kandutsch-Russel pathway » assure la synthèse du dihydrolanostérol (Figure 22).

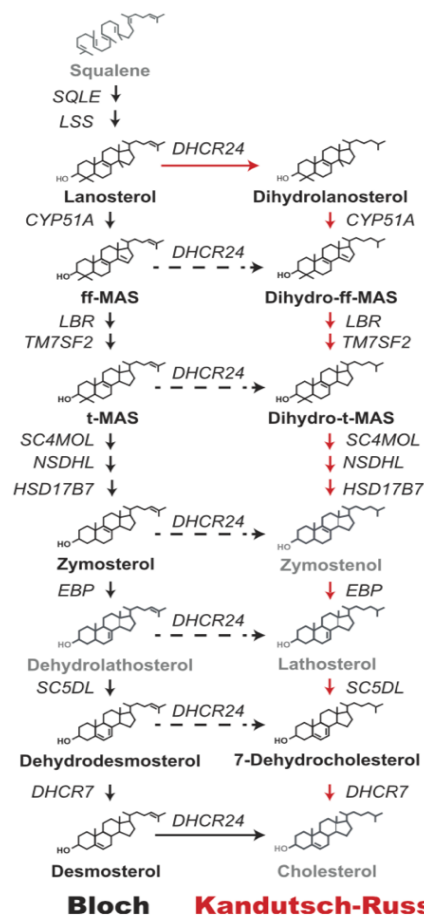


Figure 22 : Voies de synthèse du cholestérol.
Mitsche et al. *eLife*. 2015

Les astrocytes synthétisent le cholestérol majoritairement par le « Bloch pathway » tandis que l'on retrouve dans les neurones des stérols appartenant principalement au « Kandutsch-Russel pathway » (Leoni and Caccia 2013). Pendant le développement, les neurones sont capables de synthétiser le cholestérol dont ils ont besoin pour la croissance des neurites et la synaptogénèse. En revanche, à l'âge adulte, la synthèse du cholestérol intracérébral est majoritairement assurée par les astrocytes (Pfrieger 2003; Leoni and Caccia 2013), et les neurones se retrouvent dépendants d'un apport de cholestérol en provenance des cellules gliales. Le cholestérol est transporté des astrocytes jusqu'aux neurones couplé à l'apolipoprotéine E par le transporteur ABCA1 (Leoni and Caccia 2013).

* Élimination

L'excès de cholestérol, non utile aux cellules gliales et neuronales, doit être exporté vers le compartiment périphérique pour être éliminé au niveau hépatique. Cependant, le cholestérol n'est pas capable de franchir une BHE intacte (Dietschy and Turley 2004). Son élimination dépend par conséquent de deux mécanismes : la conversion en 24-hydroxycholestérol (24-OHc) et l'élimination du cholestérol couplé à l'apolipoprotéine E dans le LCR (Figure 23) (Björkhem et al. 1998).

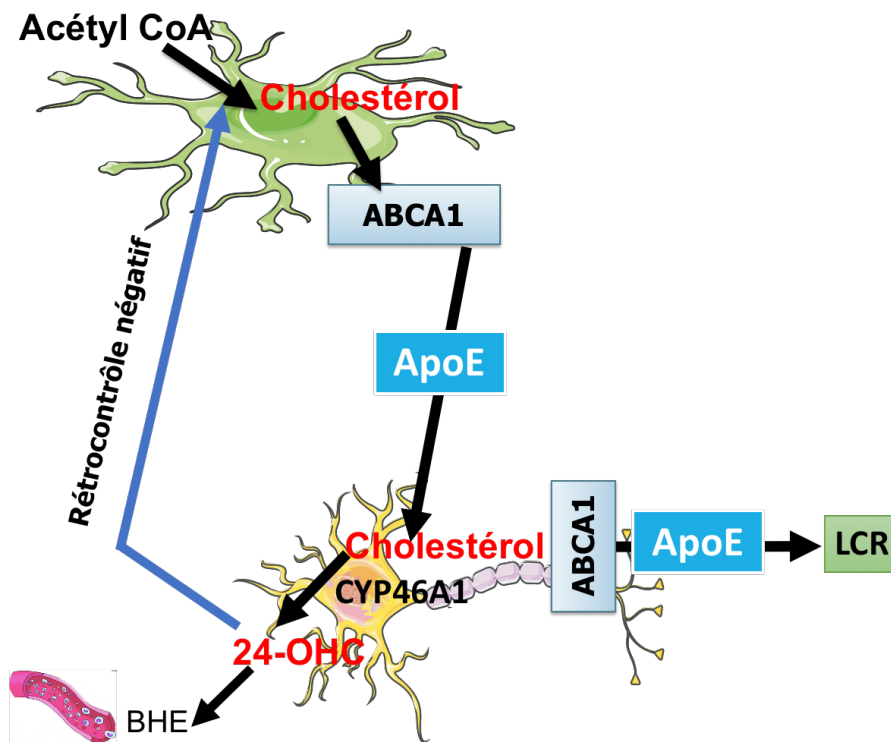


Figure 23 : Métabolisme intracérébral du cholestérol.

La conversion du cholestérol en 24-OHc représente le principal mécanisme d'élimination du cholestérol, avec un flux quotidien de 6,4 mg du cerveau vers la circulation (Björkhem et al. 1998). La formation du 24-OHc est sous la dépendance de l'enzyme cholestérol-24-hydroxylase, également appelée CYP46A1. Cette enzyme transmembranaire du réticulum endoplasmique a été décrite pour la première fois en 1999 et représente une nouvelle famille de cytochromes p450 (Lund et al. 1999). Cette enzyme est codée par le gène *CYP46A1*, localisé sur le chromosome 14q32.1, et présente 95% de similitude entre l'Homme et la souris (Lund et al. 1999). Elle présente une expression principalement cérébrale chez la souris mais est également exprimée dans le foie et les testicules. Chez l'Homme, cette enzyme possède une expression exclusivement cérébrale et principalement neuronale (Lund et al. 1999). L'analyse immunohistologique a mis en évidence une expression de la CYP46A1 dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe et du cortex, les cellules de Purkinje du cervelet et les interneurons de l'hippocampe et du cervelet (Ramirez et al. 2008). La CYP46A1 a également été détectée dans des cultures d'astrocytes (Milagre et al. 2008).

Le 24-OHc formé au niveau cérébral a la capacité, contrairement au cholestérol, de franchir la BHE et de rejoindre le compartiment systémique (Leoni and Caccia 2013). Sa concentration plasmatique est ainsi considérée comme un reflet des neurones métaboliquement actifs bien qu'une augmentation des concentrations plasmatiques ait également été décrite dans les suites d'une mort neuronale aiguë (Leoni and Caccia 2013). La concentration de 24-OHc plasmatique fluctue avec l'âge. Elle est maximale chez les enfants de 1 à 10 ans puis décroît d'un facteur cinq chez les adolescents et adultes âgés de 11 à 20 ans avant d'atteindre un plateau (Lütjohann et al. 1996; Björkhem et al. 1998; Bretillon et al. 2000).

Le second mécanisme d'élimination du cholestérol consiste en son transfert, couplé à l'apolipoprotéine E, vers le LCR (Björkhem et al. 1998; Souidi et al. 2004; Leoni and Caccia 2013). Cette élimination est sous la dépendance du transporteur ABCA1 et on estime qu'environ 1 mg de cholestérol rejoint chaque jour le LCR (Björkhem et al. 1998; Leoni and Caccia 2013).

*** Régulation de la synthèse et de l'élimination**

Outre leur rôle direct dans l'élimination du cholestérol intracérébral, la CYP46A1 et le 24-OHc contrôlent également la synthèse du cholestérol intracérébral et son élimination dans le LCR. On distingue deux mécanismes de régulation faisant intervenir respectivement les SREBP et les récepteurs LXR (*Liver X Receptor*).

La diminution de synthèse du 24-OHc entraîne le transport des SREBP vers l'appareil de Golgi. Par l'action des protéases S1P et S2P, la partie N-terminale des SREBP va se fixer aux séquences SRE et activer les gènes responsables de la synthèse du cholestérol (Souidi et al. 2004). En revanche, comme pour le cholestérol, une présence accrue de 24-OHc se traduira par une répression de l'expression génique. Le 24-OHc peut ainsi contrôler la synthèse du cholestérol par un rétrocontrôle négatif.

Le 24-OHc contrôle également l'élimination du cholestérol dans le LCR *via* une action directe sur les récepteurs LXR (Souidi et al. 2004). Les récepteurs LXR appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires, activés par des composés lipidiques tels que les hormones stéroïdiennes, la vitamine D3, les hormones thyroïdiennes, les oxystérols, ou encore les acides gras. Les oxystérols sont des ligands spécifiques des LXR.

En absence d'oxystérols, les récepteurs LXR s'associent aux récepteurs nucléaires RXR (*Retinoic X Receptor*) de l'acide rétinoïque. Ces récepteurs se fixent à l'ADN et répriment, par l'action de co-répresseurs, l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique (Souidi et al. 2004). La liaison des oxystérols ou de l'acide rétinoïque aux récepteurs LXR provoque une libération des co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs favorisant l'acétylation de l'ADN et en conséquence la transcription génique (Figure 24). Parmi les gènes concernés, on retrouve des gènes qui contrôlent l'expression de l'apolipoprotéine E et des transporteurs ABCA1 nécessaires au transport du cholestérol des astrocytes aux neurones et à son élimination dans le LCR. Les récepteurs LXR sont majoritairement présents au niveau astrocytaire. Ainsi, la fixation du 24-OHc aux récepteurs LXR favorise l'expression des gènes de l'apolipoprotéine E et du transporteur ABCA1 permettant l'efflux du cholestérol synthétisé au niveau astrocytaire jusqu'aux neurones (Leoni and Caccia 2013).

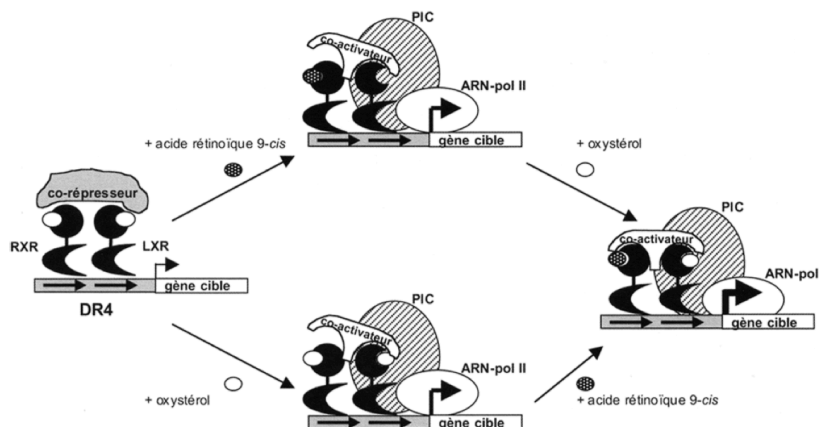


Figure 24 : Mécanisme d'action des récepteurs LXR.
Souidi et al. *Gastroenterol Clin Biol* 2004.

1.3. Modifications du métabolisme du cholestérol dans les maladies neurologiques

Une modification du métabolisme du cholestérol a été décrite dans plusieurs maladies neurologiques, dont la maladie de Huntington et la maladie d'Alzheimer.

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative qui se déclare à l'âge adulte et se traduit par des symptômes moteurs, psychiatriques et cognitifs. La maladie de Huntington est causée par l'expansion anormale de polyglutamine qui conduit à une dégénérescence des neurones du striatum (Boussicault et al. 2016). Une modification de l'homéostasie du cholestérol a été observée chez les patients souffrant de la maladie de Huntington avec notamment une accumulation de cholestérol dans les neurones du striatum et une diminution de la synthèse des précurseurs du cholestérol (Karasinska et al. 2009). Une analyse des tissus post-mortem de patients ayant présenté une maladie de Huntington a permis d'observer une diminution du niveau protéique de la CYP46A1 dans le putamen (Boussicault et al. 2016). De même, l'ARNm et les niveaux protéiques de la CYP46A1 sont diminués dans le striatum d'un modèle murin génétique de la maladie de Huntington (R6/2) (Boussicault et al. 2016). Par ailleurs, un modèle de souris KO pour le gène *CYP46A1* a permis de reproduire le phénotype de la maladie de Huntington avec une dégénérescence des neurones du striatum, des troubles moteurs et un déclin cognitif (Boussicault et al. 2016). La restauration des niveaux de la CYP46A1 chez les souris R6/2 a permis de diminuer l'atrophie neuronale, le nombre et l'intensité des résidus polyglutamine et d'améliorer le déficit moteur (Boussicault et al. 2016, 2018). La CYP46A1 semble ainsi jouer un rôle protecteur contre l'excitotoxicité et la mort neuronale observées dans la maladie de Huntington.

La maladie d'Alzheimer est la forme la plus fréquente de démence. Cette maladie se caractérise par une dégénérescence des neurones, un dépôt de plaques amyloïdes et une accumulation intracellulaire de la protéine tau phosphorylée. L'hypothèse d'un lien entre une modification de l'homéostasie du cholestérol et la maladie d'Alzheimer a émergé aux débuts des années 1990 lorsque l'allèle E4 du gène de l'apolipoprotéine E a été identifié comme un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer (Strittmatter et al. 1993).

Plusieurs études ont rapporté une augmentation des concentrations de cholestérol, libre et estérifié, chez les patients présentant une maladie d'Alzheimer avec des dépôts majoritairement situés près des plaques amyloïdes (Mori et al. 2001; Xiong et al. 2008).

Il a également été rapporté une modification des concentrations de 24-OHc chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer avec une évolution en deux temps : une augmentation lors de la dégénérescence accrue des neurones puis une diminution lorsque le stock de neurones métaboliquement actifs devient insuffisant (Leoni and Caccia 2013). Les concentrations plasmatiques de 24-OHc semblent corrélées au volume hippocampique (Koschack et al. 2009). L'inhibition de la CYP46A1, par l'injection d'un vecteur viral AAV couplé à un ARNsh dans l'hippocampe de souris, se traduit par une accumulation de cholestérol dans les neurones, un déficit cognitif, une mort neuronale et la production de plaques β -amyloïdes (Djelti et al. 2015). Un défaut d'apprentissage et de mémoire a également été relevé chez des souris KO pour le gène *CYP46A1* (Ramirez et al. 2008).

2. Quel est l'impact du cholestérol sur l'épilepsie ?

2.1. Conséquences d'une accumulation de cholestérol

Les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer ont un risque accru de présenter des crises d'épilepsie (Amatniek et al. 2006). L'augmentation de la prévalence des crises chez ces patients pourrait être expliquée par l'hypersynchronie et l'augmentation de l'excitabilité des neurones situés près des plaques amyloïdes (Busche et al. 2008; Palop and Mucke 2009). Or, une accumulation de cholestérol a également été rapportée dans les neurones situés proches des plaques (Mori et al. 2001; Xiong et al. 2008). Puisque le cholestérol participe à la régulation de la fonction et de l'ancrage des récepteurs à la membrane neuronale, l'hyperexcitabilité cellulaire décrite dans la maladie d'Alzheimer pourrait être en partie liée à l'accumulation de cholestérol dans les neurones (Pucadyil and Chattopadhyay 2006). En conséquence, nous pouvons nous interroger sur l'impact d'une accumulation de cholestérol dans la genèse des crises d'épilepsie.

Une étude a évalué l'impact d'une inhibition de la CYP46A1 par l'injection d'un vecteur viral AAV couplé à un ARNsh dans la région CA1 de l'hippocampe de souris (Chali et al. 2015). Les auteurs ont mis en évidence une accumulation de cholestérol dans les neurones de la région CA3 de l'hippocampe, 3 semaines après l'injection. L'accumulation de cholestérol était associée à une mort neuronale, reflétée par une diminution du marquage NeuN, qui débutait dans la région CA3, 4 semaines après l'inactivation de la CYP46A1 puis s'étendait à l'ensemble de la corne d'Ammon (Figure 25) (Chali et al. 2015). Une gliose touchant l'ensemble de l'hippocampe a été observée dès la quatrième semaine post injection.

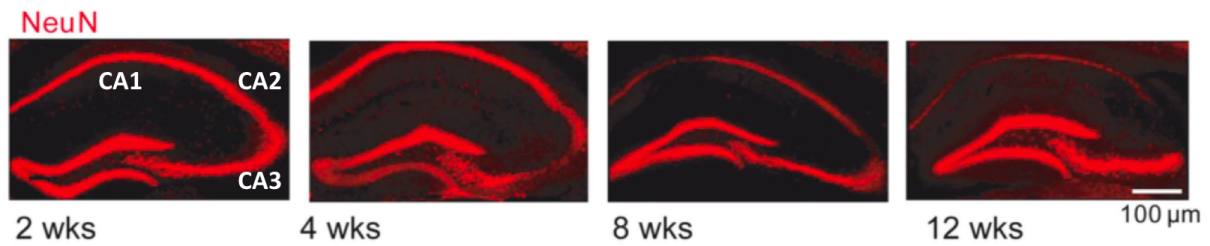


Figure 25 : Mort neuronale progressive suite à l'inhibition de la CYP46A1.
Chali et al. *European Journal of Neurosciences* 2015.

Des anomalies EEG ont été observées dans les régions touchées par une mort neuronale intense. Il a notamment été enregistré des pointes épileptiques intercritiques isolées après 6 semaines puis des décharges de pointes périodiques (Figure 26B) ou rythmiques (Figure 26D) pendant l'éveil ou le sommeil lent (Chali et al. 2015).

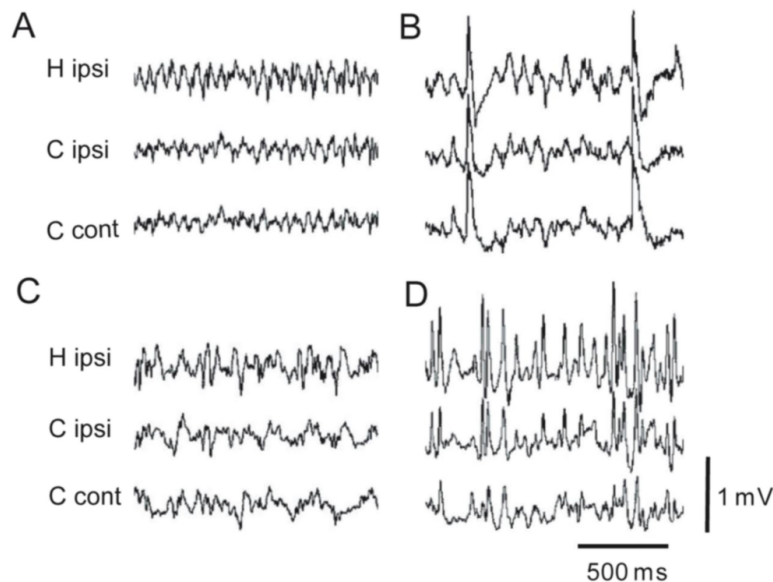


Figure 26 : Activité interictale enregistrée en CA3 après l'inhibition de la CYP46A1.
Les figures A et C représentent le tracé EEG 2 semaines après l'injection de l'inhibiteur de la CYP46A1, respectivement en phase d'éveil (A) et de sommeil lent (C). Les figures B et D représentent le tracé EEG 6 semaines après l'injection de l'inhibiteur de la CYP46A1, respectivement en phase d'éveil (B) et de sommeil lent (D). C=cortex ; H=hippocampe.
Chali et al. *European Journal of Neurosciences* 2015.

Par la suite, il a été observé un changement des patrons EEG avec l'apparition d'oscillations à haute fréquence, entre 250 et 300 Hz, lors des phases d'éveil et de sommeil paradoxal, et des décharges critiques, entre 40 et 50 Hz, d'une durée comprise entre 5 et 15 secondes (Figure 27) (Chali et al. 2015).

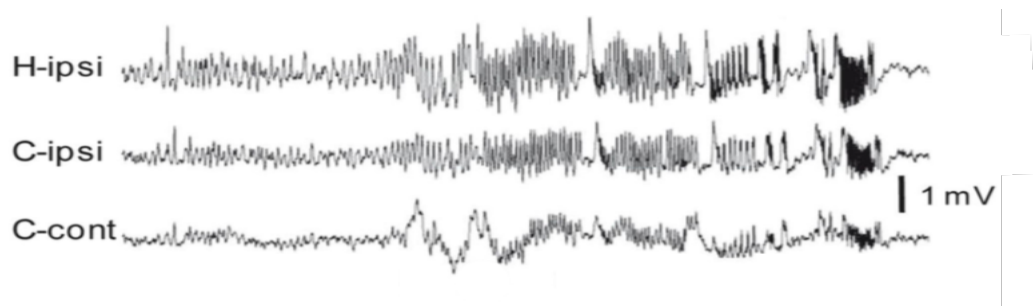


Figure 27 : Décharge critique enregistrée dans l'hippocampe injecté et les cortex ipsi et controlatéral. Le tracé EEG a été enregistré 7 semaines après l'injection de l'inhibiteur de la CYP46A1. Chali et al. *European Journal of Neurosciences* 2015.

La mort neuronale, la gliose et les crises d'épilepsie observées secondairement à l'inhibition de la CYP46A1 sont similaires aux changements cellulaires et électrophysiologiques décrits dans des modèles animaux à la suite d'un EME et chez les patients ayant présenté un EME réfractaire (Bouillieret et al. 1999). On peut par conséquent formuler l'hypothèse suivante : « la mort neuronale et l'épilepsie séquellaire survenant à la suite d'un EME pourraient être en partie provoquées par une accumulation de cholestérol dans les neurones, et pourraient en conséquence être prévenues par l'administration d'un traitement hypocholestérolémiant ».

2.2. Effets des traitements hypocholestérolémiants

Plusieurs études ont été conduites ces vingt dernières années pour évaluer l'effet de traitements hypocholestérolémiants administrés en aigu (méthyl- β -cyclodextrine) ou en chronique (statines) sur l'activité neuronale, la mort neuronale et la gliose.

Une étude conduite sur des cultures de cellules granulaires du cervelet a évalué l'effet d'une diminution de la concentration en cholestérol à la suite d'un traitement aigu par méthyl- β -cyclodextrine (m β CD) ou chronique par simvastatine (Korinek et al. 2015). La baisse de concentration en cholestérol a entraîné une diminution de la réponse glutamatergique (Figure 28A) et une désensibilisation du récepteur NMDA (Figure 28A). En revanche, aucune différence du nombre de récepteurs NMDA, ni de la durée d'ouverture du canal associé à ce récepteur, n'ont été retrouvées. Les auteurs en ont conclu que la baisse du cholestérol provoquait une réduction de la fréquence d'ouverture du canal ionique (Korinek et al. 2015). Parallèlement, ils ont mis en évidence qu'un apport en cholestérol permettait de resensibiliser les récepteurs NMDA et de potentialiser la réponse glutamatergique (Figure 28B) (Korinek et al. 2015).

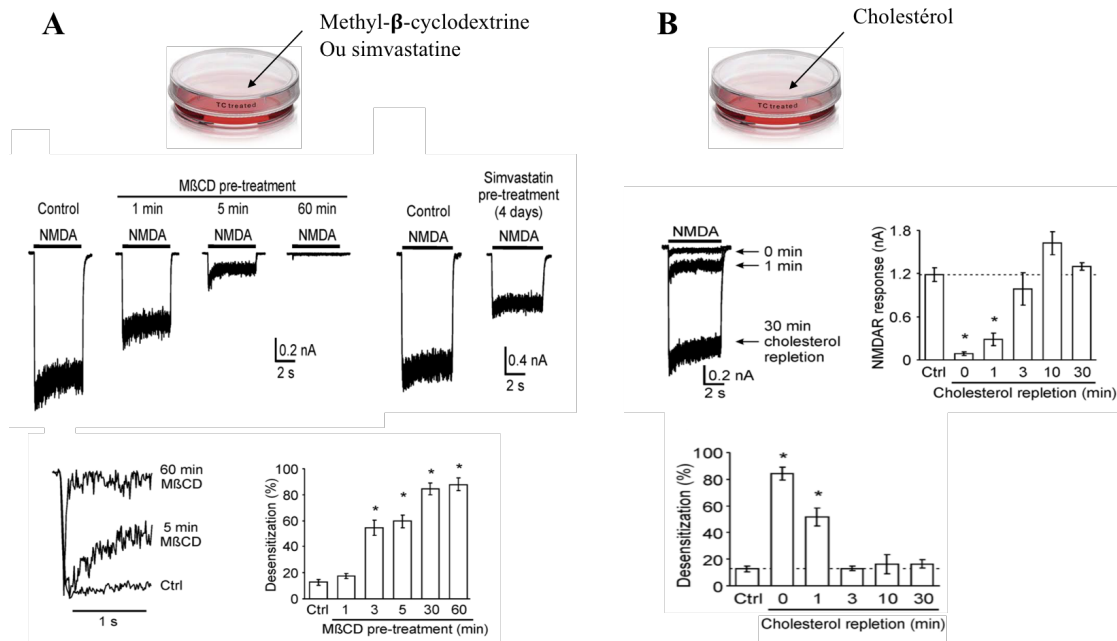


Figure 28 : Modulation de la réponse glutamatergique induite par des changements de concentration en cholestérol.

Adapté de Korinek et al. *The Journal of Physiology* 2015.

D'autres études ont rapporté un effet neuroprotecteur des statines dans des cultures de neurones exposées à une solution de NMDA, de glutamate ou de kaïnate. Elles ont mis en évidence une diminution de l'activité de la lactate déshydrogénase, signe d'une baisse de la mort neuronale, une diminution des courants NMDA et une diminution du nombre de récepteurs NMDA présents dans les radeaux lipidiques (Zacco et al. 2003; Bösel et al. 2005; Lee et al. 2008; Ponce et al. 2008). La diminution des courants NMDA se traduit par une diminution de l'entrée des ions sodiques et calciques et pourrait en conséquence entraîner une diminution de l'excitabilité neuronale et une neuroprotection en bloquant l'activation des voies d'apoptose (Walker 2018).

Les statines ont également été testées dans différents modèles animaux d'épilepsie pharmaco-résistante ou d'EME, tels que les modèles kaïnate ou pilocarpine. L'administration quotidienne intra péritonéale (IP) de l'atorvastatine pendant une semaine avant l'injection IP d'une solution de kaïnate s'est traduite par un effet neuroprotecteur, marqué par une diminution de la mort neuronale hippocampique et de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires ; et par un effet anticonvulsivant, marqué par une diminution du score de Racine qui reflète la sévérité des crises (Lee et al. 2008). Des résultats similaires ont été observés avec des administrations IP de simvastatine réalisées 24 heures avant l'induction de l'EME, par une injection IP d'une solution de kaïnate, puis après 30 minutes et quotidiennement pendant sept jours (Ramirez et al. 2011). En revanche, l'administration IP de lovastatine n'a pas permis de réduire la sévérité des crises ni la mort neuronale hippocampique (Heverin et al. 2012).

Seules deux études se sont intéressées à l'effet neuroprotecteur et antiépileptique d'un traitement hypocholestérolémiant administré après la survenue d'un EME induit par une injection de kaïnate (Lee et al. 2008; Xie et al. 2011). Tandis que l'administration aiguë de l'atorvastatine n'a pas permis de réduire la sévérité des crises (Lee et al. 2008), une administration de simvastatine quotidienne par voie orale, pendant les 14 premiers jours suivant le début de l'EME, a permis de réduire la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, de diminuer la mort neuronale et la gliose, ainsi que la fréquence des pointes intercritiques et la sévérité des crises (Xie et al. 2011).

La majorité des études conduites dans le modèle murin d'EME induit par la pilocarpine a évalué l'intérêt neuroprotecteur d'un traitement par lovastatine. L'administration de lovastatine dans les suites immédiates d'un EME a entraîné une diminution de la mort neuronale et de la libération de cytokines pro-inflammatoires (Rangel et al. 2005; Gouveia et al. 2011, 2014; Oliveira et al. 2018). L'administration quotidienne d'atorvastatine pendant 14 jours après l'injection IP de pilocarpine permettait d'améliorer les performances des animaux aux tests de reconnaissance d'objet (test de mémoire) et d'open field (test d'anxiété et de locomotion) (Oliveira et al. 2018).

Une étude rétrospective conduite chez plus de 1 million de vétérans âgés de plus de 66 ans a mis en évidence qu'une prescription de statines pour des indications cardiovasculaires était associée à un plus faible risque (odds ratio 0,64) de développer une épilepsie (Pugh et al. 2009). Une seconde étude cas-témoins a conclu qu'une prescription de statines permettait de décroître la probabilité d'hospitalisation pour épilepsie chez des patients âgés de plus de 65 ans et présentant des anomalies cardiovasculaires (Etminan et al. 2010). Une étude prospective incluant tous les patients admis pour un EME entre avril 2006 et septembre 2012 au centre hospitalier de Lausanne (Suisse) a conclu que la prise antérieure de statines était associée à une plus faible mortalité (pvalue 0,046) après correction par l'âge du patient, l'étiologie de l'EME et sa sévérité (Sierra-Marcos et al. 2015). En revanche, une étude américaine n'a pas mis en évidence d'effet bénéfique ou délétère d'une prescription au long court de statines sur le risque de développer une épilepsie dans la population générale (Trivedi et al. 2018).

Les statines ont une bonne tolérance et ont présenté des résultats prometteurs, *in vitro*, dans des modèles animaux d'EME et dans des cohortes de patients non épileptiques. Cependant, il n'existe pas d'étude clinique ayant évalué les statines comme traitement neuroprotecteur pour la prise en charge des EME réfractaires (Omar et al. 2017; Quintana-Pájaro et al. 2018).

De nouvelles études évaluant l'effet d'un traitement par statines, dans les suites d'un EME chez l'animal, sont nécessaires avant d'envisager un essai pilote chez l'Homme. Il est de plus nécessaire de mieux comprendre la physiopathologie de la régulation des concentrations de cholestérol intracérébral pendant un EME.

3. Quel est l'impact de l'état de mal épileptique sur le métabolisme du cholestérol ?

Quatre études se sont intéressées à l'impact, sur l'homéostasie du cholestérol cérébral, d'un EME induit par une injection intrahippocampique d'une solution de kaïnate chez l'animal (Kim et al. 2010; Ong et al. 2010; Heverin et al. 2012; Chali et al. 2019). Nous allons détailler les conséquences d'un EME sur la synthèse du cholestérol, son estérification, son hydroxylation et ses capacités de transport.

*** Synthèse**

Une première étude, conduite sur des broyats d'hippocampes entiers de rats préalablement injectés par une solution de kaïnate, a mis en évidence par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse : (i) une augmentation des concentrations des précurseurs de synthèse du cholestérol dans les 24 heures suivant le début de l'EME et (ii) une augmentation de la concentration de cholestérol entre le troisième et le septième jour suivant l'injection (Ong et al. 2010). Des résultats similaires ont été observés dans deux autres études respectivement conduites sur des broyat d'hippocampes entiers ou spécifiquement de la région CA1 (Kim et al. 2010; Chali et al. 2019). Une augmentation transitoire des enzymes HMG-CoA-réductase, squalène synthase et lanostérol synthase a été observée par une analyse transcriptomique conduite sur des broyats de la région CA1 (Chali et al. 2019). L'activation de ces enzymes permet une synthèse accrue de squalène et de lanostérol, précurseurs communs aux deux voies de synthèse du cholestérol. De même, il a été rapporté une augmentation de l'expression de la protéine SREBP-2 dans des cultures de neurones, dans les suites immédiates de l'injection de kaïnate (Ong et al. 2010). Cette régulation positive peut expliquer l'augmentation précoce des concentrations de cholestérol hippocampique après un EME.

Les études rapportent, par la suite, une diminution de la synthèse du cholestérol marquée par une régulation négative des enzymes après 7 jours (Kim et al. 2010; Ong et al. 2010; Heverin et al. 2012; Chali et al. 2019).

Seule une étude a décrit une diminution de la concentration en cholestérol dès le deuxième jour suivant le début de l'EME, dans l'hippocampe injecté et dans l'hippocampe controlatéral (Heverin et al. 2012). En revanche, l'injection de kaïnate a été suivie, dans cette étude, d'une administration intrapéritonéale de lorazépam pour réduire la morbidité et la mortalité associée à l'EME. Or, une diminution des concentrations de cholestérol et de triglycérides a été observée chez des rats ayant reçu une administration orale de lorazépam (Horák et al. 1976). La baisse précoce des concentrations en cholestérol pourrait ainsi être expliquée par cette association thérapeutique, ainsi que par l'atténuation de la sévérité de l'EME par cette benzodiazépine.

* **Estérification**

Une augmentation des transcripts des enzymes responsables de l'estérification du cholestérol, les ACAT 1 et 2 et la LCAT, a été observée après l'injection de kaïnate. L'augmentation débutait au bout de 24 heures et les niveaux étaient maximaux après 12 jours (Chali et al. 2019). L'activation de ces enzymes permet une synthèse accrue de cholestérol estérifié. Il a ainsi été noté une augmentation des concentrations de cholestérol estérifié une semaine après l'injection de kaïnate chez le rat (Ong et al. 2010). L'estérification du cholestérol favorise sa sortie des tissus et son élimination au niveau hépatique.

* **Hydroxylation**

Une diminution des transcripts de la *CYP46A1*, responsable de l'hydroxylation du cholestérol en 24-OHc, a été observée à la suite de l'injection de kaïnate (Chali et al. 2019). La diminution a débuté après 24 heures et les niveaux de transcripts étaient minimaux entre le deuxième et le quatrième jour (Chali et al. 2019). Une diminution des concentrations hippocampiques de 24-OHc a par ailleurs été notée dans l'hippocampe murin 24 heures après l'injection de kaïnate (Heverin et al. 2012). En revanche, une augmentation des concentrations hippocampiques de 24-OHc a été décrite au septième jour suivant l'injection (Ong et al. 2010). Cette augmentation de synthèse peut être expliquée par une activation de la *CYP46A1* au niveau astrocytaire, possiblement secondaire à l'agression cérébrale (Smiljanic et al. 2010).

Une augmentation des transcripts de l'enzyme 25-hydroxylase, responsable de l'hydroxylation du cholestérol en 25-hydroxycholestérol a été observée dans les suites de l'injection de kaïnate (Chali et al. 2019). Celle-ci débutait dans les 6 premières heures, puis augmentait progressivement jusqu'à être maximale au douzième jour (Chali et al. 2019). La synthèse accrue de 25-hydroxycholestérol peut résulter d'une adaptation de l'organisme à l'inhibition de la *CYP46A1*.

L'augmentation de synthèse du 25-hydroxycholestérol peut participer à l'excitotoxicité observée à la suite de l'injection de kaïnate, en favorisant un état pro-inflammatoire (Pokharel et al. 2019).

*** Transport**

Une augmentation permanente des transcripts de l'apolipoprotéine E et du transporteur ABCA1 a été décrite dans la région CA1 de l'hippocampe, à la suite de l'injection de kaïnate (Chali et al. 2019). Des résultats similaires ont été observés sur des lysats d'hippocampes entiers de rats, préalablement injectés par une solution de kaïnate (Ong et al. 2010).

En dépit de la hausse des ARNm, une perte d'activité du transporteur ABCA1 a été notée au niveau neuronal, tandis que ce transporteur semblait surexprimé dans les astrocytes (Kim et al. 2010; Ong et al. 2010).

L'augmentation des concentrations de l'apolipoprotéine E associée à une stimulation du transporteur ABCA1 astrocytaire favorise un apport accru du cholestérol des astrocytes jusqu'aux neurones. En revanche, la diminution d'activité du transporteur ABCA1 neuronal ne permet pas une élimination du cholestérol, couplé à l'apolipoprotéine E, dans le LCR.

Ces études soulignent le lien étroit entre l'EME et l'homéostasie du cholestérol et permettent de faire les hypothèses suivantes :

- 1) L'enzyme CYP46A1 serait inhibée dans les suites d'un EME.
- 2) La diminution de synthèse du 24-OHc provoquerait une synthèse accrue de cholestérol au niveau astrocytaire, par la perte du rétrocontrôle négatif du 24-OHc sur les SREBP.
- 3) Le cholestérol synthétisé dans les astrocytes pourrait être transporté aux neurones *via* l'augmentation de synthèse de l'apolipoprotéine E et l'activation du transporteur ABCA1 astrocytaire.
- 4) Le cholestérol serait piégé au niveau neuronal par défaut d'activité du transporteur ABCA1 neuronal et de l'enzyme CYP46A1.
- 5) L'accumulation du cholestérol au niveau neuronal pourrait participer à l'excitotoxicité observée dans les suites d'un EME.

D'autres études sont nécessaires, chez l'animal et surtout chez l'Homme, pour confirmer ces changements et étudier le lien entre le métabolisme du cholestérol central et périphérique.

Objectifs

Plusieurs biomarqueurs biochimiques, reflétant les atteintes cellulaires et moléculaires induites par l'EME (mort neuronale, neuroinflammation, changement de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, gliose, ...), ont été suggérés ces vingt dernières années. En dépit de résultats prometteurs, aucun biomarqueur n'est aujourd'hui validé pour la prise en charge des patients présentant un EME, principalement en raison d'études conduites sur des cohortes de trop faible effectif. En revanche, sur la base de leurs caractéristiques physico-chimiques et de résultats préliminaires, trois marqueurs semblent présenter un intérêt particulier pour le diagnostic positif et étiologique des EME : la Neuron Specific Enolase (NSE), la protéine S100-bêta et la progranuline. Mon travail de thèse avait comme premiers objectifs de :

- 1. Valider la valeur diagnostique de la NSE, de la protéine S100-bêta et de la progranuline sur une grande cohorte de patients en EME.**
- 2. Étudier la capacité de la NSE et de la protéine S100-bêta à refléter les anomalies électroencéphalographiques et à prédire la récurrence de crise chez des patients admis en réanimation pour un EME réfractaire.**

En plus des mécanismes physiopathologiques précédemment décrits, une altération de l'homéostasie du cholestérol intracérébral semble impliquée dans l'excitotoxicité observée lors des EME. Il a notamment été démontré, chez l'animal, qu'une accumulation de cholestérol dans les neurones induisait une mort neuronale progressive et des anomalies épileptiques, similaires à celles observées dans les suites d'un EME. En revanche, l'impact de l'EME sur l'homéostasie du cholestérol n'a jamais été évalué chez l'Homme et les études conduites dans des modèles murins présentent des résultats discordants. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les conséquences de l'EME pourrait permettre de proposer des stratégies de neuroprotection. Dans ce contexte, mon travail de thèse avait comme autres objectifs de :

- 3. Identifier de nouvelles voies physiopathologiques pouvant expliquer les conséquences délétères des EME, par une approche ciblée, avec l'étude de l'homéostasie du cholestérol, et non ciblée, avec une étude de métabolomique.**
- 4. Proposer une stratégie thérapeutique neuroprotectrice et de l'évaluer dans un modèle murin d'EME.**

Plusieurs biomarqueurs biochimiques, électrophysiologiques, cliniques, et d'imagerie ont été suggérés pour l'évaluation pronostique des patients en EME. Cependant, en raison de l'hétérogénéité des présentations cliniques et des étiologies, l'utilisation d'un seul marqueur ne semble pas suffisante pour prédire l'évolution de tous les patients présentant un EME. Ainsi, des échelles composites ont été proposées mais aucune ne peut être appliquée à tout patient en EME et de façon répétée au cours de la prise en charge. En conséquence, mon travail doctoral avait comme objectif final de :

5. Étudier l'intérêt de scores composites clinico-biologiques, obtenus par des approches d'intelligence artificielle, pour optimiser l'évaluation pronostique de tout patient admis en réanimation pour un EME, en termes de dégradation des capacités fonctionnelles, de mortalité et de capacités de récupération.

Mon travail doctoral a permis d'identifier, par une approche translationnelle, des biomarqueurs diagnostiques, de suivi, thérapeutiques et pronostiques de l'EME.

Résultats

Partie 1. Validation du potentiel de la Neuron Specific Enolase, de la protéine S100-bêta et de la progranuline comme biomarqueurs des états de mal épileptiques

1. Intérêt de la Neuron Specific Enolase, de la protéine S100-bêta et de la progranuline pour le diagnostic positif et étiologique des états de mal épileptiques

1.1. Introduction

Le diagnostic positif et étiologique précoce des EME permet la mise en place d'un traitement adapté et limite le risque de séquelles neurologiques irréversibles. Si le diagnostic des EME convulsifs, cliniquement typiques, repose sur l'évaluation clinique des patients, le diagnostic des EME non convulsifs n'est actuellement pas possible sans recourir à un EEG. Néanmoins, l'évaluation clinique, l'EEG, l'imagerie et la biologie ne permettent pas toujours d'identifier l'étiologie des EME.

Les EME s'accompagnent de nombreux changements cellulaires et moléculaires qui peuvent être suivis par l'évolution des concentrations sériques ou dans le LCR de biomarqueurs biochimiques. Plusieurs biomarqueurs ont été suggérés ces vingt dernières années dans des études conduites dans des modèles animaux d'EME ou dans des petites cohortes de patients. Parmi eux, trois biomarqueurs semblent présenter un intérêt particulier : la Neuron Specific Enolase (NSE), la protéine S100-bêta et la progranuline. En revanche, aucun de ces marqueurs n'est aujourd'hui validé pour la prise en charge des patients en EME, principalement en raison de résultats obtenus sur des cohortes de trop faible effectif.

Dans ce travail, nous avons (i) évalué l'intérêt de la NSE, de la protéine S100-bêta et de la progranuline pour le diagnostic positif des EME dans une grande cohorte de patients et (ii) nous avons étudié la capacité de la progranuline, marqueur inflammatoire, à identifier les patients qui nécessiteront des traitements immunomodulateurs pour la prise en charge de leur EME.

1.2. Démarche expérimentale

Cette étude a été conduite chez des patients adultes, admis en réanimation ou dans le service de Neurologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, entre février 2013 et mars 2021. Les patients ont été répartis en trois groupes : (i) patients admis pour un EME, (ii) patients présentant une épilepsie pharmaco-résistante sans EME et (iii) patients contrôles, sans épilepsie, pour lesquels la ponction lombaire était normale. Les patients ont eu au minimum une prise de sang et si une ponction lombaire était réalisée pour des raisons cliniques, nous avons également collecté du LCR.

Les concentrations de NSE et de la protéine S100-bêta ont été mesurées respectivement par une méthode immunofluorimétrique (Kryptor®, Brahms) et une méthode immunométrique en sandwich (Modular®E170, Roche Diagnostics). Les concentrations de progranuline ont été mesurées par un dosage en ELISA (Adipogen). Nous avons évalué l'impact des groupes par un test de Kruskal Wallis puis comparé les moyennes des concentrations entre les trois groupes à l'aide de tests de Student ou de Mann Whitney selon la distribution des valeurs. La capacité diagnostique des biomarqueurs a été évaluée à l'aide des aires sous les courbes ROC (AUC).

1.3. Résultats

Nous avons collecté des échantillons de sang chez 174 patients (82 EME, 56 épileptiques sans EME et 36 contrôles) et des échantillons de LCR chez 72 patients (34 EME et 38 contrôles).

Nous avons noté une augmentation significative des concentrations de NSE, de la protéine S100-bêta et de la progranuline dans le sang des patients en EME. Nous avons également mis en évidence une augmentation significative des concentrations de NSE et de progranuline dans le LCR des patients en EME. La protéine S100-bêta et la progranuline possèdent une bonne capacité à identifier les patients en EME (AUC respectives de 0,748 et de 0,756). Les performances de la NSE pour identifier les patients en EME étaient moins bonnes. Dans notre cohorte, 84% des patients présentant des concentrations sériques de la protéine S100-bêta supérieures à 0,09 ng/mL étaient en EME, comme 80% des patients avec des concentrations plasmatiques de progranuline supérieures à 110 ng/mL. Deux tiers des patients avec des concentrations plasmatiques de progranuline supérieures à 202 ng/mL ont nécessité un ou plusieurs traitements immunomodulateurs pour le contrôle de leur EME.

Notre étude souligne l'intérêt de la protéine S100-bêta pour le diagnostic positif d'un EME et de la progranuline pour identifier une étiologie inflammatoire d'un EME.

Ce travail a été soumis pour publication dans *Journal of Neurology*.

1.4. Article 1 : Neuron Specific Enolase, S100-beta protein and progranulin as diagnostic and etiologic biomarkers of status epilepticus.

Authors:

Aurélie Hanin, PharmD^{1,2}, Jérôme Alexandre Denis, PharmD, PhD^{3,4}, Valério Frazzini, MD, PhD^{1,2}, Louis Cousyn, MD^{1,2}, Françoise Imbert-Bismut, PharmD, PhD⁵, Benoit Rucheton, PharmD, PhD⁵, Dominique Bonnefont-Rousselot, PharmD, PhD^{5,6}, Clémence Marois, MD⁷, Virginie Lambrecq, MD, PhD^{1,2,3}, Sophie Demeret, MD⁷, Vincent Navarro, MD, PhD^{1,2,3,8}.

¹Sorbonne Université, Institut du Cerveau – Paris Brain Institute – ICM, Inserm, CNRS, APHP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris France

²AP-HP, Epilepsy Unit and Clinical Neurophysiology Department, DMU Neurosciences, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

³Sorbonne Université, Paris France

⁴AP-HP, Endocrine and Oncological Biochemistry Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

⁵AP-HP, Metabolic Biochemistry Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

⁶UTCBS, CNRS, INSERM, Université de Paris, Paris, France

⁷AP-HP, Neuro-Intensive care Unit, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

⁸AP-HP, Center of Reference for Rare Epilepsies, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

Correspondence to: Pr Vincent Navarro

Affiliation: Sorbonne Université, Institut du Cerveau – Paris Brain Institute – ICM, Inserm, CNRS, APHP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, DMU Neurosciences, Paris France

Address/City/Country: 47-83 Boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, France

Telephone: + 33 1 42 16 18 11

Email: vincent.navarro@aphp.fr

ORCID numbers:

Aurélie Hanin: 0000-0002-5912-9998

Jérôme Alexandre Denis: 0000-0002-1617-4617

Louis Cousyn: 0000-0003-1407-5575

Benoît Rucheton: 000-0002-5893-6595

Dominique Bonnefont-Rousselot: 0000-0003-4689-9202

Vincent Navarro: 0000-0003-0077-8114

Key words: Status epilepticus – Diagnosis – Etiology – Neuron Specific Enolase – S100-beta protein – Progranulin

Number of words:

- Abstract: 205 (max 250)

- Body of the manuscript: 2334

Number of references: 20

Number of figures: 2

Number of tables: 2

Supplementary files: Supplementary Table.1

Summary

Status epilepticus (SE) is a life-threatening prolonged epileptic seizure. A rapid diagnosis is fundamental to initiate antiepileptic treatment and an etiologic diagnosis is crucial to adapt therapeutics, especially for SE related to immune disorders.

Here, we aimed to assess the ability of Neuron Specific Enolase (NSE), S100-beta protein (S100B) and progranulin to help in diagnosing SE and to identify patients who would require immunomodulatory drugs to manage SE.

Blood NSE, S100B and progranulin levels were higher in SE patients when compared with control patients and patients with pharmaco-resistant epilepsy. Both NSE and progranulin levels were higher in cerebrospinal fluid from SE patients when compared with control patients. The receiver operating characteristics curves revealed good accuracy at detecting SE for serum S100B (AUC 0.748) and plasma progranulin (AUC 0.756). Eighty-four percent of patients with S100B levels above 0.09 ng/mL presented with a SE.

Plasma progranulin levels were able to identify patients who would require immunomodulatory drugs to manage SE (AUC 0.654). Especially, two-thirds of the patients with progranulin levels above 202 ng/mL required at least one immunomodulatory drug to control seizures.

Serum S100B levels might be added to clinical evaluation and electroencephalogram for diagnosing SE whereas progranulin might be used as an etiologic biomarker of SE.

Abbreviations: CONT = Control patients; CSF = Cerebrospinal Fluid; EEG = electroencephalogram; EPI = pharmaco-resistant epileptic patients; ICU = Intensive Care Unit; NPV = Negative Predictive Value; NSE = Neuron Specific Enolase, NRSE = Non-Refractory Status Epilepticus; PPV = Positive Predictive Value; PSRSE = Prolonged Super-Refractory Status Epilepticus; ROC = receiver operating characteristics; RSE = Refractory Status Epilepticus; S100B = S100-beta protein; SE = Status Epilepticus

Introduction

Status epilepticus (SE) is a life-threatening prolonged epileptic seizure, related to various etiologies and with heterogeneous clinical presentations [1]. Sustained SE may lead to brain injury and are associated with worse clinical outcomes and higher mortality [2]. The rapid diagnosis of SE is fundamental to initiate antiepileptic emergency treatments [3]. Moreover, the etiologic diagnosis is also crucial to manage efficiently the SE as prompt as possible, especially for SE related to immune disorders. Diagnosis of convulsive SE is mostly based on clinical examination. In contrast, a correct diagnosis of non-convulsive SE requires an electroencephalogram (EEG) recording [4]. Here, we wondered if biological markers could be used to help in diagnosing SE and to identify patients who would require immunomodulatory drugs to manage SE.

We considered Neuron Specific Enolase (NSE), S100-beta protein (S100B) and progranulin, which have previously been proposed as SE biomarkers [5]. They reflected respectively the neuronal injury (NSE), the astroglial injury (S100B) and the activation of microglia (progranulin) that occur in SE. Increased cerebrospinal fluid (CSF) NSE levels were reported in patients with cryptogenic or remote SE [6]. Increased serum NSE levels were also reported in patients with sustained SE with a peak between 24 and 48 hours after the SE onset [7, 8]. Despite good characteristics (good neuronal specificity, stability in the body fluids, a rapid and reliable biochemical assessment), NSE is not currently used as a diagnosis SE biomarker, mostly as previous studies were conducted on too small patient cohorts (between 2 to 31 patients) precluding the utilization of NSE as a validated diagnosis biomarker for SE [9]. S100B was mostly studied in isolated seizures but increased CSF S100B levels were reported in a rat model of SE [10–12]. S100B was not previously studied in human SE. Nevertheless, its rapid assessment and its ability to distinguish isolated epileptic seizures from psychogenic attacks make S100B a promising biomarker for SE diagnosis [12]. Increased CSF progranulin levels were first reported in a small cohort of SE patients [13]. In addition, a higher expression of progranulin was observed in a rat model of pilocarpine-induced SE and progranulin was shown able to promote the activation of microglia [14]. As a microglia/macrophage activation frequently occurs in SE related to immune disorders, progranulin might be a promising biomarker to identify patients who present SE related to immune disorders and would require immunomodulatory drugs to manage SE [15].

Here, we evaluated the diagnosis value of these three biomarkers. They were measured in blood samples from SE patients, control patients and patients with pharmaco-resistant epilepsy as well as in CSF samples from some SE patients and control patients.

Firstly, we assessed the ability of NSE, S100B and progranulin to identify SE patients and to distinguish SE from isolated seizures.

Secondly, we investigated the impact of SE etiologies on the blood biomarkers levels and we assessed the ability of plasma progranulin to identify patients who would require immunomodulatory treatments to manage their SE.

Methods

Study design, setting and participants

We prospectively enrolled adult patients admitted in intensive care unit (ICU) and neurology units of the Pitié-Salpêtrière Hospital, from February 2013 to March 2021. The protocol was approved by our local ethic committee (2012, CPP Paris-VI) and sponsored by INSERM (C16-16, 20152482). Patients or relatives were informed and give their consent. The study design and report are in accordance with the STROBE statement [16].

We included 82 patients admitted with an ongoing SE [1]. The SE end was defined as the absence of seizures after the anesthetic's withdrawal. Patients with post-anoxic SE were excluded. Patients were divided into four groups according to their SE etiology: acute, progressive, remote and cryptogenic [1]. Next, SE patients were divided into three groups: non-refractory SE (NRSE), refractory SE (RSE) and prolonged super-refractory SE (PSRSE) [17]. RSE is defined as a failure of at least two appropriately selected and dosed parenteral medications including a benzodiazepine, without any specific SE duration [17]. PSRSE is defined as a RSE that persists for at least 7 days, including ongoing need for anesthetics [17]. We further isolated patients who required the use of immunomodulatory drugs to manage SE and we qualified them as "patients with putative inflammatory SE". Possible, probable and definite autoimmune encephalitis were defined accordingly to Graus criteria [18].

We included 56 patients with pharmaco-resistant epilepsy (EPI) either during their video-EEG monitoring pre-surgical evaluation (n=17) or the day before the surgery (n=39).

We included 38 non-ICU control patients (CONT), who had no epilepsy, but psychogenic disorders, isolated non-inflammatory peripheral neuropathies and a normal lumbar puncture.

Biochemical assays

Blood and CSF samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min. Hemolytic samples (hemoglobin concentration up to 47 mg/dL) were excluded.

NSE and S100B assays were performed using respectively immunofluorimetric assays and electrochemiluminometric sandwich immunoassays (Kryptor®, Brahms and Modular®E170, Roche Diagnostics). The lowest detections were 0.8 ng/mL for NSE and 0.005 ng/mL for S100B. The coefficients of variation (CV) were found to be lower than 5% for all controls used. Progranulin measurements were performed using the progranulin-human-ELISA kit (Adipogen, Coger SAS, France). All the samples were analyzed in duplicated and progranulin measurements was repeated when CV between duplicated measures were higher than 15%.

Statistical analysis

Analyses were performed with R Software (R.3.5.0).

We first performed Kruskal-Wallis test to evaluate subgroups impact. Then, pairwise comparisons were performed using Student or Mann-Whitney when appropriate. The Benjamini-Hochberg test procedure was used to correct for multiple comparisons. Correlations between blood levels and the time between SE onset and blood sampling were evaluated by calculating respective Spearman's rho values and their level of significance. To assess the ability of biomarkers to identify patients with SE or patients who would require immunomodulatory drugs to manage SE, we computed the area under the receiver operating characteristics (ROC) curve and reported sensitivity and specificity for the best cut-off which was defined accordingly to the Youden's index [19]. Quantitative variables were expressed as mean with standard deviation. All statistical were two-sided with a type I error rate of 5%.

Data availability

All anonymized data are available on request.

Results

The study cohort is represented in Fig.1A. Main demographic data are shown in Table.1. Blood samples were collected for 36 CONT patients, 56 EPI patients and 82 SE patients. CSF samples were collected for 38 CONT patients and 34 SE patients.

Blood samples and CSF samples were collected respectively on average 7 (± 12) and 11 (± 17) days after SE onset. Twenty-nine EPI patients (52%) showed a seizure in the last forty-eight hours before the blood collection. Most EPI patients had focal seizures with impairment of consciousness (54%).

1. NSE, S100B and progranulin as diagnostic biomarkers of SE

Serum NSE levels were significantly higher in SE patients when compared with EPI patients (19.4 ± 10.2 versus 14.5 ± 5.29 ng/mL, $p=0.0074$) (Fig.1B). No significant difference was found between CONT patients and EPI patients while serum NSE levels tended to increase for SE patients when compared with CONT patients. Both serum S100B and plasma progranulin levels were higher in SE patients when compared with EPI patients (S100B: 0.14 ± 0.12 versus 0.061 ± 0.046 ng/mL, $p < 0.001$; progranulin: 137.9 ± 73.5 versus 86.6 ± 21.9 ng/mL, $p < 0.001$) and CONT patients (S100B: 0.14 ± 0.12 versus 0.059 ± 0.030 ng/mL, $p < 0.001$; progranulin: 137.9 ± 73.5 versus 94.6 ± 31.3 ng/mL, $p < 0.001$) (Fig.1B). No difference was found between CONT patients and EPI patients for both biomarkers.

Both CSF NSE and progranulin levels were significantly higher in SE patients when compared with CONT patients (NSE: 27.0 ± 31.4 versus 12.1 ± 4.63 ng/mL, $p=0.0057$; progranulin: 5.30 ± 3.08 versus 2.15 ± 0.766 ng/mL, $p < 0.001$) (Fig.1C). No significant difference was found for CSF S100B levels. Similarly, we observed an increase in the CSF/blood ratios for both NSE (1.98 ± 2.93 versus 0.75 ± 0.36 , $p=0.034$) and progranulin (0.041 ± 0.027 versus 0.024 ± 0.0076 , $p=0.0057$), while no difference was found for CSF/blood S100B ratios (Supplementary Table.1).

The ROC curves revealed good accuracy at detecting SE for: (i) serum S100B levels (AUC 0.748 [CI 95% 0.669–0.827]), with a sensitivity of 59.7%, specificity of 90.2%, positive predictive value (PPV) of 83.6% and negative predictive value (NPV) of 72.8% when using the cut-off of 0.09 ng/mL; and (ii) plasma progranulin levels (AUC 0.756 [CI 95% 0.681–0.831]), with a sensitivity of 57.3%, specificity of 85.4%, PPV of 79.7% and NPV of 66.7% when using the cut-off of 110 ng/mL (Fig.1D). Serum NSE levels can detect SE with a lower discrimination (AUC 0.624 [CI 95% 0.536–0.713]).

We next wondered if blood biomarkers levels differed accordingly to SE refractoriness and to the delay between SE onset and the blood collection. We found that only plasma progranulin levels differed accordingly to the SE refractoriness ($p < 0.001$). Plasma progranulin levels were significantly higher for PSRSE patients when compared with RSE patients (177.1 ± 95.0 versus 107.7 ± 43.0 , $p < 0.001$). Similarly, plasma progranulin levels were found correlated with the ongoing SE duration before the blood collection ($\rho = 0.360$, $p = 0.0032$) while no correlation was found for serum NSE and S100B levels (Fig.2A).

2. Progranulin as a biomarker of inflammatory SE

We then researched if these three biomarkers behave differentially according to the main SE etiologies. Serum NSE and S100B levels were not significantly different according to SE etiology whereas plasma progranulin levels tended to increase in acute SE (Fig.2B). We observed a high heterogeneity of plasma progranulin levels for these patients with acute etiology (77-490 ng/mL) (Fig.2B). It might be explained by the heterogeneity of the underlying etiologies (encephalitis $n=19$, posterior reversible encephalopathy syndrome $n=3$, metabolic disturbances $n=2$, alcohol disorders $n=2$, subdural hematoma $n=2$).

As the microglia activation occurs in immune disorders, we assessed the ability of progranulin to identify patients who would require immunomodulatory drugs to manage SE. Twenty SE patients presented with an “inflammatory SE”, defined by the need of immunomodulatory drugs. Nineteen presented with an acute SE and one patient had a progressive SE related to a Rasmussen encephalitis. Their demographic and clinical data are represented in Table.2. Most patients presented with acute or subacute onset memory deficits, altered mental status or psychiatric symptoms in addition to new-onset seizures. Four patients had normal CSF analysis. Plasma progranulin levels were increased for inflammatory SE patients when compared with the other SE patients (175.9 ± 107.8 versus 125.7 ± 54.11 ng/mL, $p = 0.048$). Plasma progranulin levels were able to identify inflammatory SE patients with an AUC of 0.648 [CI 95% 0.502–0.795], and a sensitivity of 55.0%, specificity of 72.6%, PPV of 39.3% and NPV of 83.3% when using the cut-off of 140 ng/mL (Fig.2C). Two-thirds of the patients with plasma progranulin levels above 202 ng/mL required immunomodulatory drugs to manage SE (PPV=66,7%) (Fig.2C).

Discussion

The identification of suitable biomarkers could help physicians to quickly establish a more accurate diagnosis and to identify SE etiology.

Progranulin levels were higher for SE patients when compared with CONT patients (in blood and CSF samples) and EPI patients (in blood samples). The SE patients had higher CSF NSE levels when compared with CONT patients and higher serum levels when compared with EPI patients. These results are in accordance with previous publications but were obtained in a larger cohort which support their accuracy [7, 8, 13]. As EPI patients did not have higher serum NSE levels when compared with CONT patients and presented with lower NSE levels when compared with SE patients, we may hypothesize that isolated seizures are not followed by a neuronal injury as opposed to SE. We showed, for the first time, that SE patients had higher serum S100B levels. Despite these three biomarkers were all increased in SE patients when compared with patients with isolated seizures, we believe that S100B is the most promising marker for SE diagnosis. Indeed, S100B had a higher AUC value than NSE, and it could be quickly assessed contrary to progranulin. We identified a cut-off at 0.09 ng/mL, which was accurately associated with a SE diagnosis for 84% of the patients. More than 90% of the CONT patients and EPI patients had serum S100B levels below 0.09 ng/mL. Our study highlights the potential of these biomarkers for SE diagnosis and allows to propose a cut-off for the clinical use of S100B.

We found no association between the SE etiology and the levels of serum NSE, as previously reported [8]. Plasma progranulin levels were higher in patients for whom the blood was collected several days after SE onset and therefore for PSRSE patients. The increase of the progranulin levels occurs primarily in activated microglia, which could explain the increased delay [14]. We then highlighted the potential of plasma progranulin to identify patients who would require immunomodulatory drugs to manage SE. We identified a cut-off that may guide the therapeutic strategy: two-thirds of the patients with progranulin levels above 202 ng/mL required immunomodulatory drugs to manage SE. Progranulin levels cannot be obtained in few hours. Nevertheless, as this biomarker may be preferentially used for the etiologic diagnosis, we may accept a result in some days.

We investigated the potential of NSE, S100B and progranulin as SE biomarkers in a large cohort of patients for the first time. Although our population was heterogenous for SE etiology and for the delay of enrollment after the SE onset, we found promising results for the three biomarkers. Serum S100B appears to be a promising biomarker for SE diagnosis by using the cut-off at 0.09 ng/mL and plasma progranulin could be an interesting biomarker to identify patients who may require immunomodulatory drugs by using a cut-off at 202 ng/mL.

There are some limitations for this study: it was conducted in a single center, most SE patients were enrolled in the Neuro-Intensive care unit specialized for the management of prolonged super-refractory SE and therefore, the collection of blood and CSF samples was delayed for patients who were previously managed in another hospital. In addition, CONT patients and EPI patients were not managed in ICU units. Nonetheless, the strengths of our study were to collect samples for a larger cohort of patients and to provide cut-off for clinical using. Further studies are needed to investigate the ability of progranulin to distinguish specific autoimmune disorders to better manage patients [20]. In addition, further studies should be performed to assess the ability of these biomarkers to diagnose encephalopathies and autoimmune encephalitis without SE.

Declarations

Funding

This work received support from the “Investissements d’avenir” program ANR-10-IAIHU-06, from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FDM20170839111) and from the Fondation Assitance Publique-Hôpitaux de Paris (EPIRES- Marie Laure PLV Merchandising).

Conflicts of interest

Vincent Navarro reports personal fees from UCB Pharma, Eisai, GW Pharma and LivaNova, outside the submitted work.

Others authors report no disclosures.

Availability of data and material

All data are available on request upon the corresponding author.

Code availability

Not applicable.

Author’s contributions

Drafting the manuscript for content: Aurélie Hanin, Vincent Navarro

Major role in the acquisition of data: Aurélie Hanin, Jérôme Alexandre Denis, Valério Frazzini, Françoise Imbert-Bismut, Benoît Rucheton, Clémence Marois, Virginie Lambrecq

Study concept and design: Aurélie Hanin, Dominique Bonnefont-Rousselot, Sophie Demeret, Vincent Navarro

Analysis or interpretation of data: Aurélie Hanin, Jérôme Alexandre Denis, Valério Frazzini, Sophie Demeret, Vincent Navarro

Statistical analysis: Aurélie Hanin

Obtaining funding: Aurélie Hanin, Vincent Navarro

Revising the manuscript for content: Jérôme Alexandre Denis, Valério Frazzini, Françoise Imbert-Bismut, Benoît Rucheton, Dominique Bonnefont-Rousselot, Clémence Marois, Virginie Lambrecq, Sophie Demeret.

Ethics approval

The protocol was approved by our local (2012, CPP Paris-VI) and by the INSERM ethic committees (C16-16, 20152482). The study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

Consent to participate

Patients or relatives were informed and give their consent.

Consent for publication

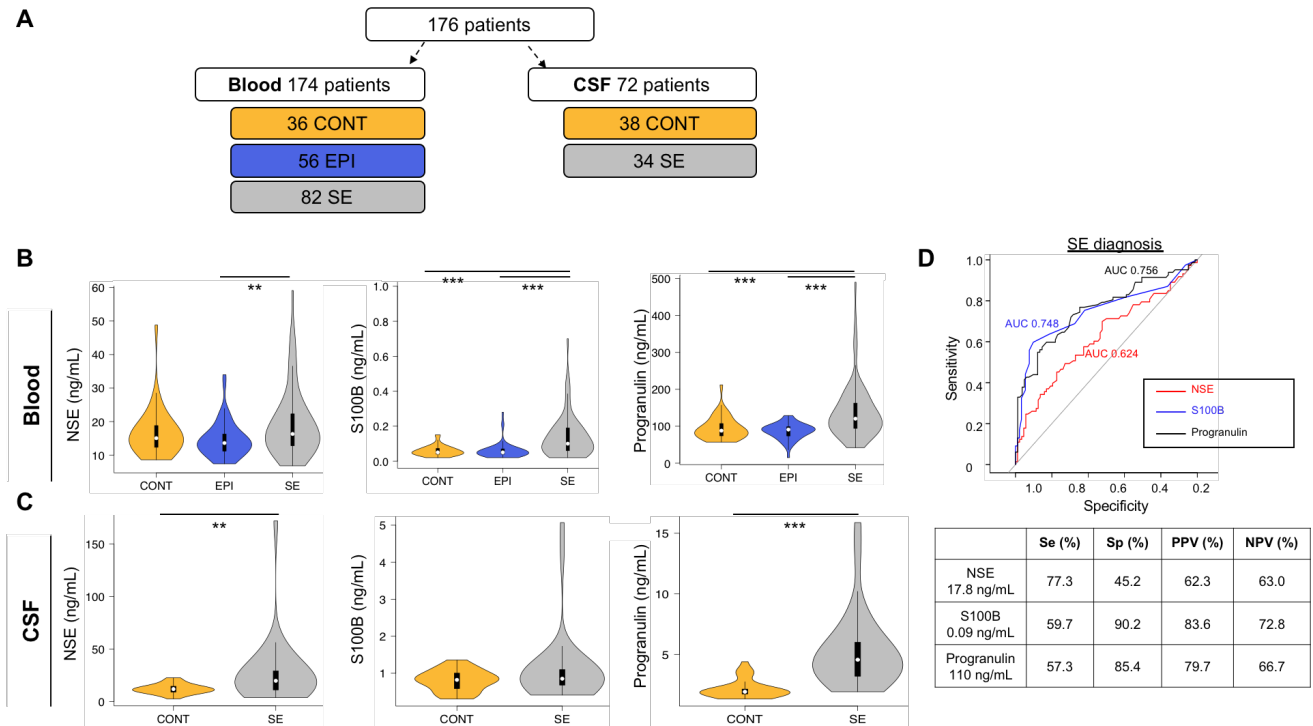
Patients or relatives were informed and give their consent.

References

1. Trinka E, Kälviäinen R (2017) 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. *Seizure* 44:65–73. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.11.001>
2. Alkhachroum A, Der-Nigoghossian CA, Rubinos C, Claassen J (2020) Markers in Status Epilepticus Prognosis. *J Clin Neurophysiol* 37:422–428. <https://doi.org/10.1097/WNP.0000000000000761>
3. Claassen J, Goldstein JN (2017) Emergency Neurological Life Support: Status Epilepticus. *Neurocrit Care* 27:152–158. <https://doi.org/10.1007/s12028-017-0460-1>
4. Leitinger M, Beniczky S, Rohracher A, et al (2015) Salzburg Consensus Criteria for Non-Convulsive Status Epilepticus--approach to clinical application. *Epilepsy Behav* 49:158–163. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.007>
5. Hanin A, Lambrecq V, Denis JA, et al (2020) Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus. *Epilepsia* 61:6–18. <https://doi.org/10.1111/epi.16405>
6. Correale J, Rabinowicz AL, Heck CN, et al (1998) Status epilepticus increases CSF levels of neuron-specific enolase and alters the blood-brain barrier. *Neurology* 50:1388–1391
7. DeGiorgio CM, Correale JD, Gott PS, et al (1995) Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology* 45:1134–1137
8. DeGiorgio CM, Heck CN, Rabinowicz AL, et al (1999) Serum neuron-specific enolase in the major subtypes of status epilepticus. *Neurology* 52:746–749
9. Gnanapavan S, Hegen H, Khalil M, et al (2014) Guidelines for uniform reporting of body fluid biomarker studies in neurologic disorders. *Neurology* 83:1210–1216. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000809>
10. Vizuete AFK, Hennemann MM, Gonçalves CA, de Oliveira DL (2017) Phase-Dependent Astroglial Alterations in Li-Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Young Rats. *Neurochem Res* 42:2730–2742. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2276-y>
11. Freund Y, Bloom B, Bokobza J, et al (2015) Predictive value of S100-B and copeptin for outcomes following seizure: the BISTRO International Cohort Study. *PLoS ONE* 10:e0122405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122405>
12. Asadollahi M, Simani L (2019) The diagnostic value of serum UCHL-1 and S100-B levels in differentiate epileptic seizures from psychogenic attacks. *Brain Res* 1704:11–15. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.09.028>
13. Huchtemann T, Körtvélyessy P, Feistner H, et al (2015) Progranulin levels in status epilepticus as a marker of neuronal recovery and neuroprotection. *Epilepsy & Behavior* 49:170–172. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.06.022>

14. Zhu S, Tai C, Petkau TL, et al (2013) Progranulin promotes activation of microglia/macrophage after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Research* 1530:54–65. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.023>
15. Tan TH-L, Perucca P, O'Brien TJ, et al (2021) Inflammation, ictogenesis, and epileptogenesis: An exploration through human disease. *Epilepsia* 62:303–324. <https://doi.org/10.1111/epi.16788>
16. Cuschieri S (2019) The STROBE guidelines. *Saudi J Anaesth* 13:S31–S34. https://doi.org/10.4103/sja.SJA_543_18
17. Hirsch LJ, Gaspard N, van Baalen A, et al (2018) Proposed consensus definitions for new-onset refractory status epilepticus (NORSE), febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES), and related conditions. *Epilepsia* 59:739–744. <https://doi.org/10.1111/epi.14016>
18. Graus F, Titulaer MJ, Balu R, et al (2016) A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol* 15:391–404. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00401-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00401-9)
19. Fluss R, Faraggi D, Reiser B (2005) Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point. *Biom J* 47:458–472. <https://doi.org/10.1002/bimj.200410135>
20. Abboud H, Probasco JC, Irani S, et al (2021) Autoimmune encephalitis: proposed best practice recommendations for diagnosis and acute management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-325300>

Fig.1 Neuron Specific Enolase, S100-beta protein and progranulin as diagnosis biomarkers of status epilepticus

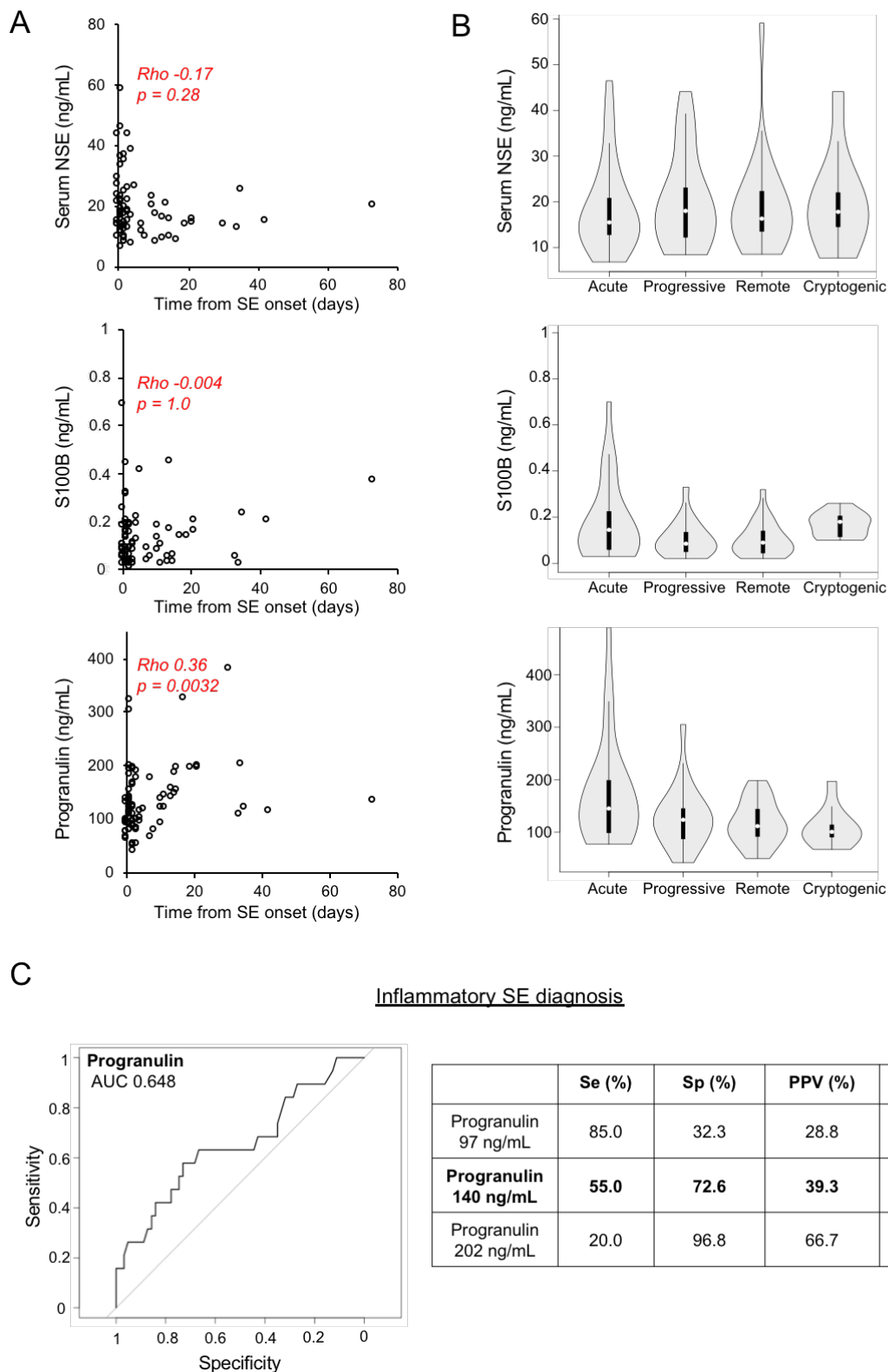


The Fig.1A represents the number of patients for each group (CONT, EPI, SE) and each biological compartment (blood, CSF).

The Fig.1B and Fig.1C represent respectively the distribution of NSE levels (up), S100B levels (middle) and progranulin levels (down) in blood (Fig.1B) and in CSF (Fig.1C). The violin plots show the density of the data at different levels. The white point represents the median of the data, the dark box indicates the interquartile range and the two end points represent respectively the maximum and the minimum values (except for outliers).

The Fig.1D shows the ROC curves for serum NSE (red), serum S100B (blue) and plasma progranulin (black) to identify patients with SE. The table below represents the values of sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for the best cut-off of each biological marker, defined according to the Youden's index.

Fig.2 Progranulin as a biomarker of inflammatory status epilepticus



The Fig.2A shows the relations between serum NSE levels (up), serum S100B levels (middle) and plasma progranulin levels (down) and the time between the SE onset and the blood sampling. The correlations were assessed with the Spearman test.

The Fig.2B represents the distribution of serum NSE levels (up), serum S100B levels (middle) and plasma progranulin levels (down) according to the SE etiologies. The white points represent the median of the data, the dark boxes indicate the interquartile ranges and the two end points represent respectively the maximum and the minimum values (except for outliers).

The Fig.2C shows the progranulin ROC curve to assess the risk to present with an inflammatory SE. The table on the right represents the values of sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for several cut-offs. The line in bold corresponds to the best cut-off, defined according to the Youden's index.

Table.1 Demographic characteristics of the study cohort.

	Patients N (%)	Age (years \pm sd)	Ratio M/F (%)
SE patients	82	49.8 \pm 18.8	60
Acute	28 (34)	49.1 \pm 19.7	57
Progressive	20 (24)	52.4 \pm 19.8	70
Remote	24 (29)	48.8 \pm 19.1	54
Unknown cryptogenic	10 (12)	49.4 \pm 15.3	60
Patients who required immunomodulatory drugs	20 (24)	42.7 \pm 21.0	60
NRSE	25 (30)	55.5 \pm 16.7	64
RSE	32 (39)	51.3 \pm 18.8	63
PSRSE	25 (30)	42.2 \pm 18.8	52
EPI patients	56	35.9 \pm 11.2	48
CONT patients	36	54.1 \pm 20.7	50

Data are represented as percentages or mean \pm standard deviation (sd)

Abbreviations: CONT = Control patients; EPI = pharmaco-resistant Epileptic patients; F = Female; M = Male; NRSE = Non-Refractory Status Epilepticus; PSRSE = Prolonged Super-Refractory Status Epilepticus; RSE = Refractory Status Epilepticus; SE = Status Epilepticus

Table.2 Demographic and clinical data from inflammatory SE patients.

	Sex	Age (y)	SE etiology	Treatments	Criteria for immunomodulatory treatment initiation
1	F	74	LGI1 encephalitis	IVIG CTC	Subacute onset (3-6 months) Cognitive disorders New-onset tonic-dystonic seizures <i>Normal MRI and CSF analysis</i>
2	M	48	SE of unknown etiology	CTC IVIG PLEX	Multifocal and drug-resistant epilepsy of unknown etiology Lymphocytic pleocytosis and OCB on CSF analysis <i>Normal brain MRI</i>
3	M	41	Autoantibody-negative but probable AI encephalitis	CTC PLEX	Subacute onset (<3 months) Cognitive disorders Psychiatric disorders (auditory hallucinations) New-onset seizures Right temporo-frontal hyperintensity on MRI Inflammatory infiltrates CD4+ T cells on meningeal and brain biopsy <i>Normal CSF analysis</i>
4	M	75	Herpes simplex encephalitis with negative HSV PCR	IVIG	Acute onset (a few days) Cognitive disorders New-onset temporal seizures Left mesial temporal FLAIR hyperintensity Pleocytosis on CSF analysis (OCB not performed)
5	M	19	NMDA _R encephalitis	IVIG CTC PLEX Rituximab	Acute onset (<1 month) Cognitive and psychiatric disorders (agitation, anxiety) Orofacial dyskinesia New-onset seizures Pleocytosis and OCB on CSF analysis <i>Normal brain MRI</i>
6	F	41	Possible AI encephalitis	CTC IVIG	Acute onset (a few days) Cognitive disorders New-onset seizures Mild pleocytosis on CSF analysis <i>Normal brain MRI</i>
7	F	56	Possible AI encephalitis	IVIG	Acute onset (a few days) Cognitive disorders New-onset seizures Pleocytosis on CSF analysis Diffuse EEG slow waves <i>Normal Brain MRI</i>
8	F	17	Autoantibody-negative but probable AI encephalitis	IVIG	Acute onset (a few days) Cognitive (obnubilation) and behavioral disorders (agitation) New-onset seizures Lymphocytic pleocytosis on CSF analysis Lepto and pachymeningitis on brain MRI
9	F	68	Possible AI encephalitis	IVIG CTC	Acute onset (a few days) New-onset seizures Mild intrathecal synthesis (1 OCB) on CSF analysis Context of metastatic breast cancer <i>Normal brain MRI</i>
10	F	16	Rasmussen encephalitis	CTC PLEX Rituximab	Subacute onset (3-6 months) Psychiatric disorders New-onset and drug-resistant seizures Left parietal hyperintensity and edema, and frontal pachymeningitis brain MRI OCB on CSF analysis Positive antinuclear antibodies Thymic hyperplasia on CT

11	M	39	Definite AI limbic encephalitis	CTC IVIG	Acute onset (<1 month) New-onset seizures Bilateral mesial temporal FLAIR hyperintensity on brain MRI Diffuse slow waves on EEG <i>Normal CSF analysis</i>
12	M	26	Autoantibody-negative but probable AI encephalitis	CTC PLEX	Subacute onset (<3 months) Behavioral and psychiatric disorders New-onset seizures Left mesial temporal FLAIR hyperintensity on brain MRI Pleocytosis on CSF analysis Diffuse continuous slow waves on EEG
13	F	47	CNS lupus	PLEX CTC	Acute onset (a few days) New-onset seizures Temporo-insular hyperintensity on brain MRI Mild pleocytosis on CSF analysis
14	F	28	Measles encephalitis	IVIG CTC	Subacute onset (<3 months) New-onset drug-resistant seizures Diffuse contrast-enhanced hyperintensities on brain MRI Diffuse periodic slow waves on EEG OCB on CSF analysis Inflammatory infiltrates on brain biopsy
15	M	19	Possible AI encephalitis	IVIG	Acute onset (a few days) New-onset seizures Mild pleocytosis on CSF analysis <i>Normal brain MRI</i>
16	M	54	Definite AI limbic encephalitis	IVIG CTC	Acute onset (a few days) Cognitive disorders New-onset seizures Bilateral mesial temporal hyperintensity on brain MRI Diffuse epileptiform activity on EEG <i>Normal CSF analysis</i>
17	M	35	Definite AI limbic encephalitis	CTC PLEX Rituximab	Acute onset (a few days) Cognitive disorders Orofacial dyskinesia New-onset seizures Lymphocytic pleocytosis on CSF analysis Bilateral mesial temporal hyperintensity on brain MRI
18	M	18	Autoantibody-negative but probable AI encephalitis	CTC IVIG PLEX	Acute onset (a few days) New-onset seizures Lymphocytic pleocytosis on CSF analysis Parieto-temporal hyperintensity on brain MRI
19	M	51	NMDA _R encephalitis	CTC IVIG PLEX Rituximab	Subacute onset (<3 months) Cognitive and behavioral disorders Lymphocytic pleocytosis on CSF analysis
20	M	82	Possible AI encephalitis	CTC	Acute onset New-onset drug-resistant focal seizures Pleocytosis on CSF analysis <i>No argument for autoimmunity on brain MRI</i>

Abbreviations: AI = autoimmune, CNS = central nervous system; CSF = cerebrospinal fluid, CTC = corticosteroids, IVIG = intravenous immunoglobulins, OCB = oligoclonal bands, PLEX = plasma exchange, SE = Status Epilepticus.

Infectious encephalitis was excluded for all patients before the implementation of the immunomodulatory treatment. Possible, autoantibody-negative but probable AI encephalitis and definite AI encephalitis were defined accordingly to Graus criteria [18].

Supplementary Table.1 Biological data from SE patients and CONT patients.

CSF/blood	NSE	S100B	Progranulin
SE	1.98 ± 2.93 (n=21)	13.40 ± 12.51 (n=25)	0.041 ± 0.027 (n=27)
CONT	0.75 ± 0.36 (n=26)	16.75 ± 9.84 (n=32)	0.024 ± 0.0076 (n=31)
Pvalue Wilcoxon-test	0.034	0.052	0.0057
AUC [CI 95%]	0.681 [0.510-0.852]	0.651 [0.501-0.802]	0.713 [0.569-0.857]

Abbreviations: CONT = Control patients, SE = Status Epilepticus

2. La surveillance EEG continue, un outil indispensable à la prise en charge de l'état de mal épileptique réfractaire

2.1. Introduction

En dépit d'une prise en charge thérapeutique adaptée, près de 25% des EME sont réfractaires aux traitements antiépileptiques et nécessitent une prise en charge en réanimation et le recours à une anesthésie générale (Rossetti and Lowenstein 2011). La prise en charge de l'EME réfractaire repose sur un compromis délicat : l'anesthésie générale permet d'arrêter les crises et de protéger le cerveau mais une sédation trop prolongée accroît le risque de complications médicamenteuses ou infectieuses, ainsi que la durée du séjour en réanimation et à l'hôpital.

La surveillance EEG continue est un outil crucial dans la prise en charge de ces patients car elle permet (i) de détecter la survenue de crises non-convulsives ou d'un EME non convulsif chez des patients anesthésiés et curarisés, (ii) d'assurer une titration optimale des agents anesthésiques pour avoir un juste équilibre entre le risque de récurrence de crise et une sédation excessive et (iii) d'évaluer le pronostic des patients.

Différents scores basés totalement ou partiellement sur les résultats de l'EEG ont été proposés ces dernières années pour faciliter le diagnostic de l'EME non convulsif (critères de Salzburg), pour estimer le pronostic des patients (score EMSE) ou pour prédire le risque de récurrence de crise (score 2HELPS2B) (Beniczky et al. 2013; Leitinger et al. 2015b; Struck et al. 2017).

Près d'un tiers des patients admis pour un EME convulsif présentent en réanimation des crises non-convulsives (Limotai et al. 2019). Un cinquième présentent un EME non convulsif (Limotai et al. 2019). Les crises peuvent être précédées par des changements visibles à l'EEG, qui fluctuent dans le temps et dans les régions cérébrales atteintes. La surveillance EEG continue est actuellement le seul moyen d'évaluer le risque de récurrence de crise au cours du temps. Cependant, les outils d'analyse actuels, et notamment le score 2HELPS2B, ne permettent pas d'estimer le risque de récurrence de crise sur de longues périodes d'enregistrement (Struck et al. 2017).

Dans ce travail, nous avons (i) proposé un nouveau score EEG, nommé EaSiBUSSEs, et (ii) testé sa capacité à prédire la récurrence de crise dans les 24 heures suivant l'évaluation du score.

2.2. Démarche expérimentale

Nous avons premièrement réalisé une revue de la littérature pour estimer le risque de crise associé à chacune des anomalies électroencéphalographiques et l'impact de la prévalence des anomalies et de leur fréquence sur le risque de crise.

Nous avons proposé, à partir de ces données, un score EEG établi sur 7 niveaux, nommé EaSiBUSSEs (*EEG-based seizure build-up score in status epilepticus*), qui permet de quantifier la propension des patrons EEG à s'associer à des crises, en fonction de leur morphologie et de leur prévalence. Un score de 1 correspond à un tracé EEG normal, sans anomalie épileptique, tandis qu'un score de 7 témoigne de la présence de crises sur plus de 20% du tracé, ou de décharges périodiques continues avec des accélérations rythmiques fréquentes.

Nous avons testé la capacité de ce score à prédire la récurrence des crises sur une cohorte de patients admis en réanimation pour un EME réfractaire. Les patients inclus dans cette étude ont eu au minimum 3 jours de surveillance EEG continue. Les EEG ont été scorés, indépendamment et en aveugle, sur des fenêtres temporelles de 3 heures, par le Dr Virginie Lambrecq et le Pr Vincent Navarro.

Nous avons évalué la puissance de ce score à l'aide de l'aire sous la courbe ROC (AUC) et sa reproductibilité intra et inter-investigateur à l'aide du coefficient de corrélation intra-classe.

2.3. Résultats

L'étude a été conduite sur une cohorte de onze patients qui ont eu en moyenne 14 jours d'enregistrement EEG continu. Les analyses ont été réalisées sur un total de 103 jours.

Nous avons tout d'abord observé une très bonne reproductibilité intra-investigateur (ICC 0,916) et inter-investigateur (ICC 0,935) pour l'évaluation du score EaSiBUSSEs.

Nous avons démontré que ce score permettait d'estimer avec une AUC de 0,903 le risque de récurrence de crise dans les 24 heures chez un patient admis pour un EME réfractaire. Nous avons identifié un seuil à 5, avec une sensibilité de 93,6%, une spécificité de 72,0%, une valeur prédictive positive de 75,9% et une valeur prédictive négative de 92,3%.

Cette étude souligne l'intérêt du score EaSiBUSSEs pour un suivi prolongé des patients admis en réanimation pour un EME réfractaire.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal *Neurophysiologie Clinique - Clinical Neurophysiology*.

2.4. Article 2 : Continuous EEG monitoring in the follow-up of convulsive status epilepticus patients: a proposal and preliminary validation of an EEG-based seizure build-up score (EaSIBUSSEs). Neurophysiologie Clinique – Clinical Neurophysiology.



March
2021
Vol. 51/2
p. 101–196

ISSN 0987-7053

Neurophysiologie Clinique Clinical Neurophysiology

Fields of application of cEEG after status epilepticus

cEEG	Correlation between EEG patterns and clinical features		
Prognostic values			
Mortality			
EMSE			
Seizure risk			
2HEEFS2B			
Seizure build-up after status epilepticus (EaSIBUSSEs)			

From "Continuous EEG monitoring in the follow-up of convulsive status epilepticus patients: a proposal and preliminary validation of an EEG-based seizure build-up score (EaSIBUSSEs)" by Aurélie Hanin, Sophie Demeret, Vi-Huong Nguyen-Michel, Virginie Lambrecq, and Vincent Navarro, in this volume

VIEWPOINT

Continuous EEG monitoring in the follow-up of convulsive status epilepticus patients: A proposal and preliminary validation of an EEG-based seizure build-up score (EaSIBUSSEs)
A. Hanin, S. Demeret, V.-H. Nguyen-Michel, V. Lambrecq and V. Navarro

ORIGINAL ARTICLES

Robot-assisted versus stereotactic frame-based stereoelectroencephalography in medically refractory epilepsy
J. Zheng, Y.-L. Liu, D. Zhang, X.-H. Cui, L.-X. Sang, T. Xie and W.-L. Li

Quantitative approach to early neonatal EEG visual analysis in hypoxic-ischemic encephalopathy severity: Bridging the gap between eyes and machine
L. Lacari, N. Beltrami, M.-D. Lambin, L. Chato, A. Delval, J.-L. Bourriez, L. Storme, P. Derambure and S. NguyenThe Tich

Are neurophysiologic tests reliable, ultra-early prognostic indices after cardiac arrest?
R. Carrai, M. Spalletti, M. Scarpino, F. Lolli, G. Lanzo, C. Cossu, M. Bonizzoli, F. Socci, C. Lazzari, A. Amantini and A. Grippo

Cortical spreading depolarization and ketamine: a short systematic review
J.P.M. Telles, L.C. Welling, A.C.S.d.S. Coelho, N.N. Rabelo, M.J. Teixeira and E.G. Figueiredo

Comparison of figure-of-8 and circular coils for threshold tracking transcranial magnetic stimulation measurements
S. Ørskov, H. Bostock, J. Howells, K. Pugdahl, A. Fugisang-Frederiksen, C.S. Nielsen, B. Cengiz, G. Samușyte, M. Koltzenburg and H. Tankisi

Understanding intracortical excitability in phantom limb pain: A multivariate analysis from a multicenter randomized clinical trial
P.E.P. Teixeira, K. Pacheco-Barrios, M.E. Gunduz, A.C. Gianlorenco, L. Castelo-Branco and F. Fregni

Application of CMAP scan for the evaluation of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a prospective study
A.A. Okhovat, S. Advani, K. Moradi, B. Ziaadini, A. Panahi, S. Nafissi, B. Haghi Ashtiani and F. Fatehi

Electrophysiological features of acute inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with SARS-CoV-2 infection
A. Uncini, C. Foresti, B. Frigeni, B. Storti, M.C. Servalli, S. Gazzina, G. Cosentino, F. Bianchi, U. Del Carro, E. Alfonsi, S.C. Piccinelli, G. De Maria, A. Padovani, M. Filosto and L. Ippoliti

SHORT COMMUNICATION

Sudomotor dysfunction in patients recovered from COVID-19
A. Hinduja, A. Moutairou and J.-H. Calvet

Continuous EEG monitoring in the follow-up of convulsive status epilepticus patients: A proposal and preliminary validation of an EEG-based seizure build-up score (EaSIBUSSEs)

Aurélie Hanin, Sophie Demeret, Vi-Huong Nguyen-Michel, Virginie Lambrecq, Vincent Navarro

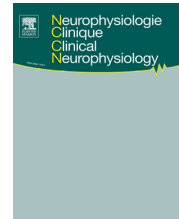


Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com/en



VIEWPOINT

Continuous EEG monitoring in the follow-up of convulsive status epilepticus patients: A proposal and preliminary validation of an EEG-based seizure build-up score (EaSiBUSSEs)



Aurélien Hanin^a, Sophie Demeret^b, Vi-Huong Nguyen-Michel^b,
Virginie Lambrecq^{a,b,c,1}, Vincent Navarro^{a,b,c,d,*,1}

^a Paris Brain Institute, ICM, Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Université, F-75013, Paris, France

^b AP-HP, Epilepsy Unit and Clinical Neurophysiology Department (VHNM, VL, VN), Neuro-Intensive Care Unit (SD), Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

^c Sorbonne Université, Paris, France

^d Center of Reference for Rare Epilepsies, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

Received 8 October 2020; accepted 31 January 2021

Available online 26 February 2021

KEYWORDS

Continuous EEG monitoring;
Diagnosis;
Prognosis;
Score;
Seizure risk;
Status epilepticus

Abstract Continuous electroencephalography (EEG) is a major tool for monitoring patients admitted to the intensive care unit after refractory convulsive status epilepticus, following control of convulsive movements. We review the values of different EEG patterns observed in critically ill patients for prognosis and seizure risk, together with proposed criteria for non-convulsive status epilepticus diagnosis (Salzburg Criteria), the EEG scores for prognosis (Epidemiology-based Mortality score in Status Epilepticus, EMSE) and for seizure risk (ZHELPS2B). These criteria and scores, based partially on continuous EEG, are not tailored to repetitively monitor the progressive build-up leading to seizure or status epilepticus recurrence. Therefore, we propose a new EEG-based seizure build-up score in status epilepticus (EaSiBUSSEs), based on the morphology and the prevalence of the EEG patterns observed in the follow-up of convulsive status epilepticus patients. It displays subscores from the least (no interictal activity) to the most associated with seizures (focal or generalized status epilepticus). We then evaluated the performance of the EaSiBUSSEs in a cohort of eleven patients who were admitted to intensive care unit for convulsive status epilepticus and who underwent

* Corresponding author at: Paris Brain Institute, ICM, Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Université, F-75013, Paris, France.

E-mail address: vincent.navarro@aphp.fr (V. Navarro).

¹ These authors contributed equally to the manuscript.

A. Hanin, S. Demeret, V.-H. Nguyen-Michel et al.

continuous EEG recording. The receiver operating curve revealed good accuracy in identifying patients who would have seizures in the next 24h, with excellent intra- and inter-rater reliability. We believe that this score is simple to perform, and suitable for repeated monitoring of EEG following refractory convulsive status epilepticus, with quantitative description of major EEG changes leading to seizures.

© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Continuous electroencephalography (cEEG) has been increasingly used for brain monitoring in the critical care setting for (i) detection of non-convulsive seizures (NCS) or non-convulsive status epilepticus (NCSE), in particular for patients with unexplained consciousness disorders or delirium; (ii) titration of continuous intravenous (IV) antiepileptic drug therapy in patients with refractory status epilepticus (SE); (iii) outcome assessment of patients with severe brain injury or neurological deterioration; and (iv) early detection of delayed cerebral ischemia during vasospasm after subarachnoid hemorrhage [24].

Recent meta-analysis indicates a high prevalence of NCS and NCSE detected by cEEG (17.9% and 9.1% respectively), compared to those detected by routine electroencephalography (EEG) (3.1% and 6.2% respectively) in critically ill adults with mixed causes of admission [29].

Nowadays, most professional societies recommend cEEG for the management of refractory SE [4,9,15]. To avoid bias in EEG interpretation and to facilitate communication, the American Clinical Neurophysiology Society proposed the Standardized Critical Care EEG Terminology (SCCET) [16]. All EEG patterns observed in intensive care units (ICU) are thus classified by their localization (generalized, lateralized, bilateral independent and multifocal patterns) and morphology (periodic discharges [PDs, also known as periodic epileptiform discharges], rhythmic delta activity [RDA] and spike-and-wave or sharp-and-wave [SWs]). Sub-classifications are defined by modifiers, such as the prevalence, the frequency, or the presence of additional *plus* features (in which case the pattern appears more ictal than the usual term without the *plus*).

Here, we reviewed the available literature on EEG-based criteria, or scores used for patients with SE (Fig. 1), to diagnose non-convulsive SE or to evaluate prognostic value and seizure risk. We then proposed and evaluated a new score to quantify the pro-epileptiform potential of EEG patterns in the context of daily repeated monitoring of pathological activities related to SE during the ICU stay.

EEG findings associated with SE diagnosis

The definition of SE proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) distinguishes two time points: t1, when a seizure is likely to be prolonged leading to continuous seizure activity—5 min for generalized tonic-clonic SE, 10 min for other SE—; t2, when a seizure may cause long-term consequences—30 min for generalized tonic-clonic SE and 60 min for focal SE with impairment of consciousness [46].

This diagnostic classification of SE distinguished four axes: semiology, etiology, EEG correlates and age. None of the ictal EEG patterns is specific for any particular form of SE. Therefore, there are no consensus EEG criteria for the diagnosis of each SE type [46,47]. The diagnosis of convulsive SE, when clinically typical, does not require EEG recording. In contrast, a correct diagnosis of NCSE is not possible without EEG recording. The ‘‘Salzburg EEG criteria for NCSE’’ have been proposed as a practical guide for NCSE diagnosis [2,25,27]. Their diagnostic accuracy was evaluated in a recent retrospective study from EEG recording of patients admitted for neurological symptoms, with a sensitivity of 97.7% and a specificity of 89.6% [27].

Together, these arguments strengthen the idea that cEEG combined with continuous video recording could have a high potential for identifying seizures or the occurrence (or recurrence) of SE, in patients admitted to the ICU for refractory SE or any other neurological reason [29,49].

EEG findings associated with prognosis

We found no formal consensus regarding which EEG patterns are associated with ongoing neuronal injury, which situations need to be treated and how to prevent poor prognosis [19]. Nevertheless, several studies have evaluated the relationship between various EEG patterns and mortality or outcome, in large populations [1,11,17,28,31–33,35,40,42,45,48] as well as in etiology-selected patient groups [3,5,8,10,36,38].

Prognostic value of EEG patterns

Periodic discharges have been demonstrated to be associated with poorer outcome, but on different levels, depending on their lateralization [5,28,42], their etiology [17] and other clinical characteristics (age, comorbidities, history of SE, drug toxicities) [28]. Lateralized periodic discharges [LPDs] are the most widely studied EEG pattern. These discharges are often observed in structural brain lesions such as stroke, central nervous system (CNS) infections and tumors [19]. Patients with LPDs have mortality rates ranging from 5% to 50% [5,17,28,33,40,42,48], and poor outcomes ranging from 30% to 64% [5,17,28,33,40,48]. Both generalized PDs [GPDs] and bilateral independent PDs [BiPDs] are commonly associated with post-anoxic coma and other (sub)acute injuries [19]. Patients with GPDs have very high rates of mortality, ranging from 27% to 85% [3,5,11,28,33,38] and half of them [33], or even 64% of those with CNS infections [5], become functionally dependent. Patients with BiPDs have mortality rates ranging from 25%

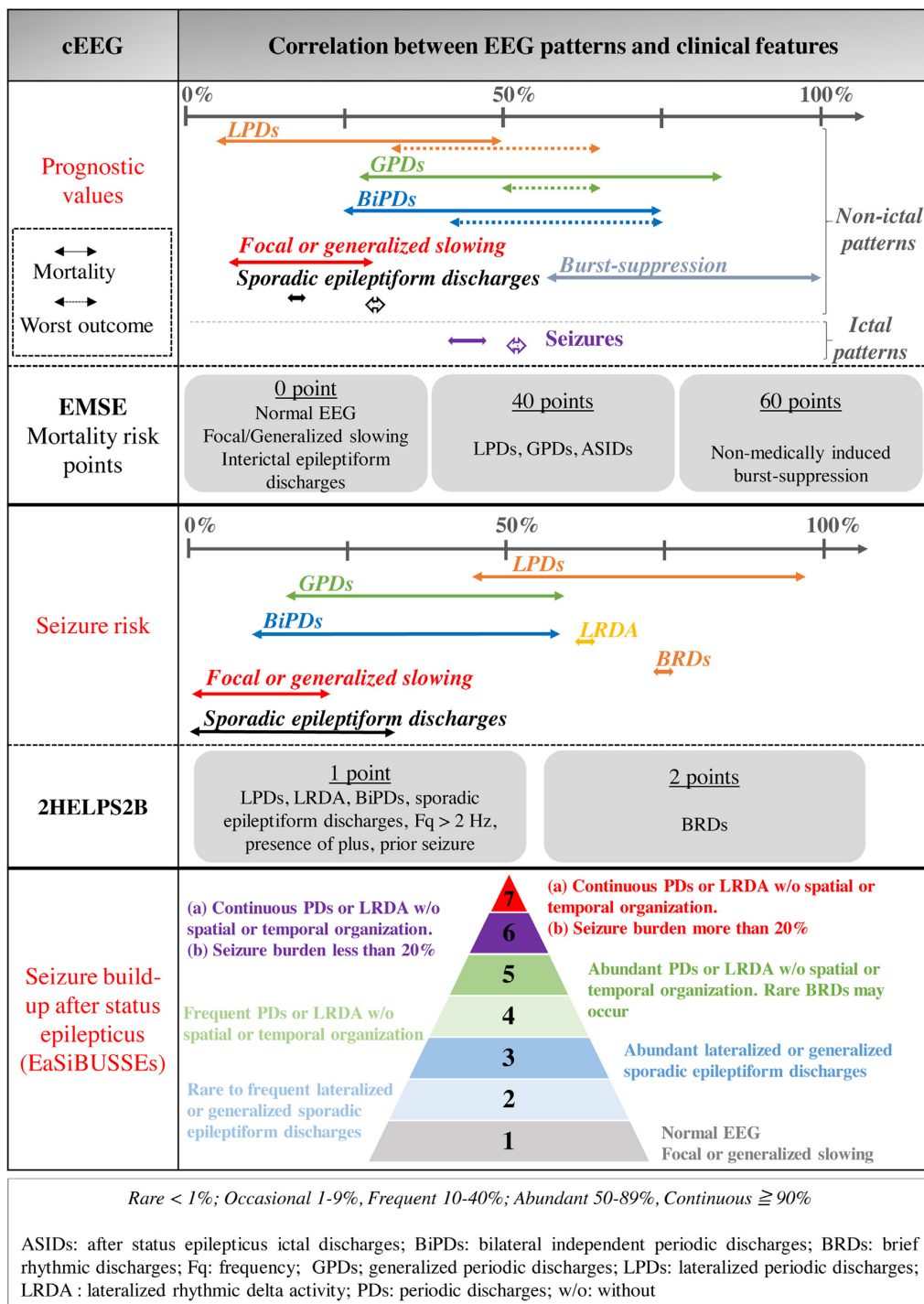


Figure 1 Fields of application of cEEG after status epilepticus.

to 75% [5,28,33,38,42], and poor outcomes ranging from 39% to 75% [5,28,33]. These disparities in mortality rates could firstly be explained by underlying etiologies. For example, the lowest mortality score was reported in patients with-

out acute or progressive brain injury [40], while the highest score corresponded to patients with post-anoxic refractory SE [3]. Other factors may strongly influence mortality: age over 65 years (Odds ratio, OR 2.55), systemic infection (OR

2.23), anoxic encephalopathy (OR 2.28) and occurrence of SE (OR 2.59) [28].

Focal and generalized non-rhythmic slowing show less association with poor outcomes. Patients with focal and generalized non-rhythmic slowing have lower mortality rates, ranging from 7% to 30% [17,22,31]. In contrast, non-medically induced burst-suppression appears to be the worst EEG pattern, associated with mortality rates ranging from 59% to 98% according to etiology [3,17].

Sporadic epileptiform discharges were recorded in 28 out of 180 patients during a 24-h period after clinical SE [17]. Of them, 18% died and 29% presented a poor outcome at time of discharge. This EEG pattern was not predictive of outcome, in contrast to other patterns (burst-suppression or PDs).

An EEG background attenuation was recorded in 47 out of 180 patients after convulsive status epilepticus. Of them, 15 (32%) died and 21 (45%) presented a poor outcome at hospital discharge [17]. In critically children, 64% of those with EEG background attenuation died [45].

Convulsive seizures and NCS are frequently reported in critical care patients. The prevalence of seizures in patients undergoing cEEG in ICU is 13%–59% [5,7,8,11,18,23,28,33,41,49]. The presence of clinical or electrographic seizures is associated with poorer outcomes. Indeed, among 180 patients admitted for treatment of convulsive SE, 96 presented 'After Status epilepticus Ictal Discharges' (ASIDs) on EEG monitoring with a high rate of mortality (41%) and poor outcome (53%) [17]. A high rate of mortality (47%) was also found in patients with post-anoxic refractory SE [3]. Nevertheless, beyond the occurrence of seizures, the *seizure burden* (i.e. the maximum percentage of any hour that is occupied by an electrographic seizure [35], or the duration, in hours, of seizures on cEEG [10]) and the ictal fraction (i.e. the total seizure duration out of the cEEG recording duration [36]) may have significant prognostic value. A study conducted on 38 newborns showed that the mean seizure duration and the duration of the longest seizure were not related to the outcome, contrary to the ictal fraction when it exceeded 17% (10 min per hour) [36]. Another study conducted on 259 children admitted to ICU, identified a *seizure burden* threshold of 20% per hour (12 min) above which, the probability and the magnitude of neurological decline rose sharply whatever the diagnosis [35]. In adults with spontaneous subarachnoid hemorrhage (n=402), the *seizure burden* was associated with unfavorable functional and cognitive outcome and every hour of seizure was associated with an OR of 1.10 to 3-month disability and mortality [10].

Quantitative assessment of prognostic value according to EEG patterns: epidemiology-based mortality score

An epidemiology-based mortality score in SE (EMSE) was recently proposed to better evaluate outcome. Using a combination of four items (etiology, age, comorbidity and EEG), this score could explain mortality in 90% of cases, and predicted both poor and good outcome better than the previous SE severity score [26]. The EEG item was classified into three subgroups with corresponding mortality risk points: (i) normal EEG, non-specific EEG abnormalities (focal or

generalized slowing) or interictal epileptiform discharges [0 point]; (ii) LPDs, GPDs or ASIDs [40 points] and (iii) non-medically induced burst suppression [60 points] [26]. Later studies have confirmed effectiveness of the EMSE in assessing SE prognosis [13,20,34].

Taken together, these findings indicate that non-medically induced burst-suppression is the worst EEG pattern, followed by PDs then by sporadic epileptiform discharges and focal and generalized non-rhythmic slowing. Ictal events occurring after a SE, in particular those with a high *seizure burden* are associated with a poor outcome. EMSE is an efficient prognostic score.

EEG findings associated with seizure risk

In order to study the risk of seizures based on EEG findings, it is crucial to correctly recognize interictal EEG patterns and to differentiate them from ictal ones. In practice, electroencephalographers often meet three situations: (i) EEG patterns are unequivocally ictal (typical EEG features with temporally and spatially organized epileptiform activities; or clinical and EEG manifestations promptly improving after intravenous antiepileptic drug) [2], (ii) EEG patterns are clearly non-ictal, and (iii) ambiguous, unclear EEG features, which are difficult to classify into ictal or non-ictal patterns, in particular those with sequences of periodic discharges or rhythmic activities. With the use of long-term cEEG in ICU, new EEG patterns of unclear or unknown significance have increasingly been reported. Consequently, they are still not included in treatment strategies [51]. Some EEG patterns are described in the SCCET: lateralized RDA [LRDA], generalized RDA [GRDA] and stimulus-induced rhythmic, periodic, or ictal discharges [SIRPIDs], while other ones (brief (potentially ictal) rhythmic discharges [B(I)RDs] and ictal-interictal continuum [IIC] are not covered by the terminology [16]. The IIC was described as fluctuating, rhythmic and/or periodic activity, without clear onset or offset [51]. We now examine the risk of seizures associated with the different patterns.

Seizure risk from EEG patterns

Among the periodic patterns, LPDs are most consistently associated with seizures, with an incidence of clinical or electrographic seizures ranging from 44% to 92% [7,8,12,18,28,33,37,39,40,42,44,48] according to etiology, seizure type or level of consciousness. Seizures occur in 16%–58% of patients with GPDs, and are therefore less common in patients with GPDs compared to those with LPDs [7,11,28,33,39,44]. The association between these both patterns and seizures increases with pattern prevalence, higher frequencies (above 2 Hz), and presence of *plus* features [39].

Focal or generalized slowing are not associated with increased risk of seizures [12,44]. Among 558 critically ill patients, those with focal non-rhythmic EEG slowing (n=136) had less seizures (20%) than those with LPDs (n=49; 57% of seizures) [12]. In another series of 112 patients with generalized slowing as the initial EEG pattern, none of them showed seizures [44].

Sporadic epileptiform discharges were reported to be associated with seizures in less than 31% of the cases [22,41,44].

Lateralized rhythmic delta activity (LRDA), mostly reported in intracerebral and subarachnoid hemorrhages, carries a similar risk of seizures as LPDs (63% versus 57%) in a study conducted on 558 critically ill patients [12]. As for LPDs and GPDs, LRDA are associated with a higher risk of seizures when the patterns show higher frequencies (above 2 Hz) and *plus* features. On the contrary, GRDA were not associated with seizures, even if showing *plus* features, higher frequencies or prevalence [39].

Stimulus-induced rhythmic, periodic, or ictal discharges (SIRPIDs) correspond to rhythmic, periodic or ictal-appearing activities that are elicited by patient stimulation [19]. There is an ongoing debate about whether SIRPIDs should be classed as ictal or interictal activities. In order to determine whether SIRPIDs represent an ictal phenomenon or not, a SPECT study in a patient presenting SIRPIDs did not show any increase of brain perfusion; SIRPIDs in this patient might therefore not be an ictal pattern [52]. Conversely, disappearance of SIRPIDs was observed in another patient after receiving benzodiazepines, suggesting that SIRPIDs might behave like seizures [21]. A recent study in a large cohort of patients examined whether the seizure risk changed when the periodic or the rhythmic activities were induced by stimulation. Their preliminary findings indicated no significant difference in the incidence of seizures and showed 20% of patients with LRDA elicited by stimulation versus 28% of patients with spontaneous LRDA; similarly, the risk of seizure was 17% for patients with GPD, elicited or not by stimulation. Therefore rhythmic and periodic patterns observed after stimulation seem not to represent an additional risk for seizures [39].

Brief (ictal or interictal) rhythmic discharges (B(I)RDs) are defined as rhythmic discharges lasting less than 10 s. Up to 75% of patients with B(I)RDs are reported to have seizures [50].

Quantitative assessment of seizure risk according to EEG patterns: 2HELPS2B score

The largest series of patients on cEEG monitoring has contributed to major descriptions of different EEG patterns [39]. A quantitative evaluation tool of seizure risk according to EEG patterns was then proposed: the 2HELPS2B score [43]. This score is the sum of points according to one clinical and five EEG variables: prior seizure [1 point], brief (ictal) rhythmic discharges (B(I)RDs) [2 points], presence of LPDs, LRDA, BiPDs [1 point], sporadic epileptiform discharges [1 point], frequency greater than 2 Hz of periodic or rhythmic pattern [1 point] and presence of *plus* features [1 point]. The estimated seizure risk was 5% with a score of 0, 12% with a score of 1, 27% with a score of 2, 50% with a score of 3, 73% with a score of 4, 88% with a score of 5, and greater than 95% with a score of 6 or 7 [43]. The same team recently tested this score in a subpopulation of patients with acute brain injury and found that the 2HELPS2B score was not superior to EEG, but was superior to clinical factors in evaluating seizure risk [30]. However, it could be queried whether LPDs or LRDA really predict the same seizure risk as sporadic epileptiform discharges do, given that they all count for 1 point.

These findings together indicate that PDs highly increase the risk of seizures, followed by sporadic epileptiform dis-

charges, while focal and generalized slowing do not. Among new EEG patterns of uncertain significance, B(I)RDs and LRDA increase the risk of seizures while SIRPIDs and GRDA do not. The prevalence of events, the EEG pattern frequency, and the *plus* features contribute to seizure risk. The 2HELPS2B is an effective score to evaluate seizure risk even if some questions remain unanswered.

EEG findings associated with seizure build-up after SE

There is a need for a specific score in order to monitor EEG activity after refractory SE, which should respond to multiple purposes: (i) to quantitatively describe major EEG changes leading to seizure(s), (ii) to monitor therapeutic trials evaluating the drugs to block seizure recurrence or to allow a neuroprotective effect, and (iii) to further examine the relationship between the ‘‘seizure build-up’’ and the kinetics of various biomarkers assessing brain injuries [14].

In patients with refractory convulsive SE receiving anesthetics, the question of seizures or SE recurrence is of major importance. Continuous electroencephalography is crucial to monitor ictal events, notably while doses of anesthetics are being reduced. Non-convulsive seizures and NCSE occur frequently after post-convulsive SE (33.5% and 20.2% respectively) [29], with a large variability in localization and morphology of ictal and inter-ictal patterns [6]. In super-refractory SE, the dynamics of seizure or SE recurrence can be even more complex. Seizures may not reoccur suddenly but be preceded by a continuum between non-ictal and ictal events, which fluctuate both spatially and temporally (personal observations).

The current scores for cEEG described above are not tailored to repeatedly monitor the progressive build-up leading to seizure or SE recurrence. The ESME EEG subscore does not distinguish epileptiform from non-epileptiform events [26]. The 2HELPS2B score includes additional items based on EEG patterns and their features. This score is however not easily applied for repeated assessments because of fixed items such as ‘previous seizure’ [43]. Secondly, this score attributes the same value to different patterns: the sporadic epileptiform discharges and the LPDs or LRDA all count for 1 point, despite the fact that they have been associated with unequal seizure risk in previous studies [8,12,22,28,37,39–41,43,44]. Thirdly, it does not take into account the prevalence of the EEG pattern, despite a higher risk of seizures having been reported when the patterns have higher prevalence [39]. Finally, it does not assess the different impact of an isolated ‘previous seizure’ when compared with a higher seizure burden.

We therefore propose an EEG-based seizure build-up score in status epilepticus (EaSiBUSSEs) to quantify the pro-epileptiform potential of several EEG patterns observed after convulsive SE in patients undergoing cEEG monitoring in ICU. We defined seven EEG subscores based on morphology and prevalence of EEG patterns, rising from the least associated with seizure (no interictal activity) to the most associated and severe one (focal or generalized SE). We provide a detailed description of each score (Fig. 2) and corresponding EEG examples (Figs. 3 and 4).

A. Hanin, S. Demeret, V.-H. Nguyen-Michel et al.

Score	Definition	Model	
1	Background EEG with no interictal or ictal epileptiform discharges		
	Background EEG activity with non-specific EEG abnormalities (including focal or generalized slowing)		
2	Background EEG activity with lateralized or generalized, sporadic (rare < 1%, occasional 1-9% to frequent 10-49%) interictal epileptiform discharges (including spikes, polyspikes)		
3	Background EEG with lateralized or generalized, abundant (50-89%) interictal epileptiform discharges (including spikes, polyspikes)		
4	Background EEG activity with frequent (10-49%) periodic discharges (LPDs, GPDs, BiPDs) or LRDA without spatial or temporal organization, from 0.1 to 1.5/s	Scattered activities	
		Grouped activities	
5	Background EEG activity with abundant (50-89%) periodic discharges (LPDs, GPDs, BiPDs) or LRDA, without spatial or temporal organization from 0.1 to 1.5/s. Rare (<1%) BRDs, above 1.5/s, without spatial or temporal organization may occur	Scattered activities	
		Grouped activities	
6	(a) Continuous ($\geq 90\%$) periodic discharges (LPDs, GPDs, BiPDs) or LRDA, without spatial or temporal organization from 0.1 to 1.5/s; with occasional (1-9%) BRDs, above 1.5/s; no background activity		
	(b) Seizure burden less than 20%		
7	(a) Continuous ($\geq 90\%$) periodic discharges (LPDs, GPDs, BiPDs) or LRDA, without spatial or temporal organization from 0.1 to 1.5/s, with frequent (10-49%) BRDs, above 1.5/s; no background activity		
	(b) Seizure burden more than 20%		

*The GRDA and SIRPIDs were not included in this score, because they were shown not to be associated with seizures⁴⁹

Figure 2 Definition and model of the EEG-based seizure build-up score in status epilepticus (EaSiBUSSEs).

Seven EEG subscores were defined from the pattern least associated with seizure risk (no interictal activity) to the most severe one (focal or generalized SE). They depict the morphology and prevalence of EEG patterns in EEG epochs. The grey boxes represent the background activity. The green lines represent the focal or generalized slowing, the black lines the sporadic epileptiform discharges, the blue lines the PDs (BiPDs, LPDs and GPDs) and LRDA, the purple lines the BRDs and the red lines the seizures. The seizure burden is estimated as the total duration of seizures out of the total duration of cEEG recording. Abbreviations: BiPDs = bilateral independent periodic discharges; BRDs = brief rhythmic discharges; GPDs = generalized periodic discharges; LPDs = lateralized periodic discharges; LRDA = lateralized delta rhythmic activity.

This seizure build-up score was designed from robust findings of previous studies which have evaluated the association of EEG patterns with seizure risk in critically ill patients. The risk of NCS or NCSE is higher in patients undergoing cEEG monitoring after refractory convulsive SE cessation than in those after traumatic brain injury or intracerebral hemorrhage [7]. There is no literature to the best of our knowledge suggesting that the seizure risk related to periodic or rhythmic activities could change according to the primary etiological diagnosis and the referral indication of cEEG monitoring. On the other hand, a study conducted on a large cohort of patients showed an association between EEG patterns and seizure risk by using multivariate logistic regression models, whatever the primary etiological diagnosis including status epilepticus [39]. We therefore assume to apply their findings in our population with status epilepticus to build the EaSiBUSSEs.

Normal EEG or EEG with focal or generalized slowing is associated with a seizure risk ranging from 0% to 20% [score 1] [12,39,44]; sporadic epileptiform discharges from 0% to 31% [scores of 2 or 3, depending on their low or high prevalence] [22,41,44]; PDs from 16% to 92% [8,11,28,33,39,40,44,48], while LRDA shares similar seizure risk with LPDs [12] [scores of 4 or 5, depending on their low or high prevalence].

We did not take into account the side of lateralization of PDs because all PDs were associated with seizures in over-

lapping ranges (LPDs: 44%–92%; GPDs: 16%–58%, and BiPDs: 10%–58%) [39].

We allocated the same subscore 6 for both continuous PDs or LRDA without spatial or temporal organization, with occasional brief rhythmic discharges (BRDs) (6a), and for infrequent seizures (seizure burden <20%) (6b). We allocated the same subscore 7 for both continuous PDs or LRDA without spatial or temporal organization, with frequent BRDs (7a), and for frequent seizures (seizure burden $\geq 20\%$) (7b). We attributed the same subscore for these patterns because we consider that they need the same clinical monitoring and might be treated equally. We distinguished subscores 6 and 7 according to the seizure burden, with a threshold of 20%, which was validated in children admitted to ICU and provided a prognostic value [35,36].

GRDA and the rhythmic or periodic patterns induced by stimulation were not included in this score, because they were not associated with increased seizure risk [39].

Evaluation of the EaSiBUSSEs for clinical use

In order to enhance the understandability and facilitate the use of the EaSiBUSSEs, we provided a decision-making flowchart to the electroencephalographers (Supplementary Fig.1). We then evaluated the EaSiBUSSEs in 11 patients admitted in ICU for refractory convulsive SE and underwent at least 72 h of cEEG recording. EEG were independently

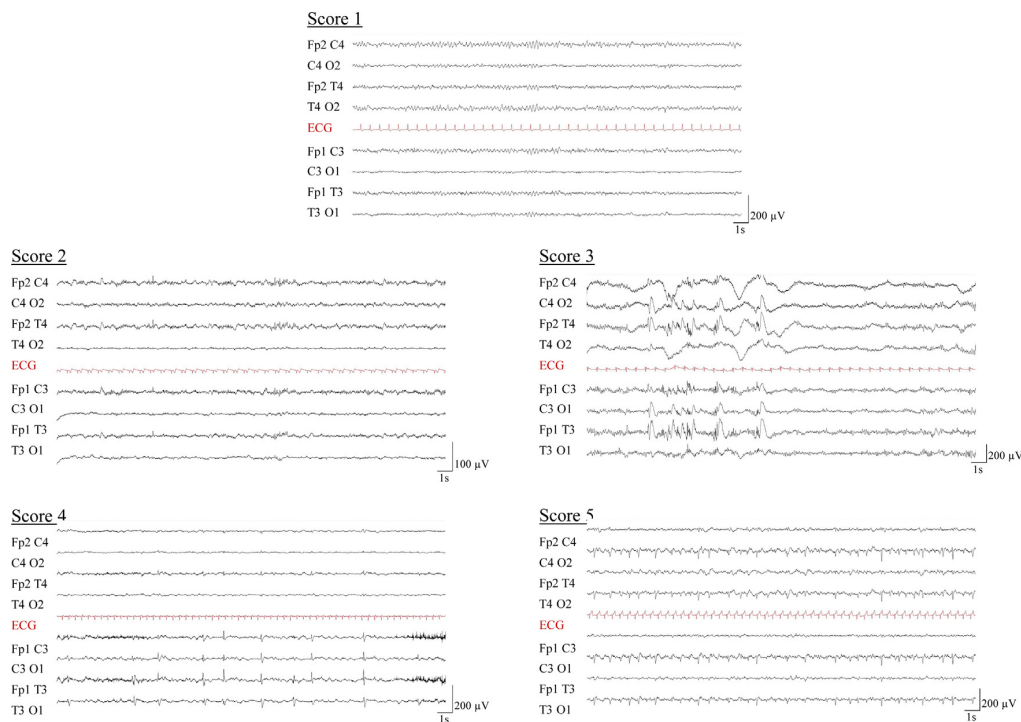


Figure 3 Raw EEG examples of each subscore from 1 to 5. Each EEG example (8 electrodes, longitudinal bipolar montage, low frequency filter 0.53 Hz, high frequency filter 70 Hz) corresponds to a 30s-epoch extracted from a 3 h-analysed period, for display purpose. Subscore 1 = Interictal EEG with generalized slowing in a 58-year-old man who presented a nonconvulsive status epilepticus, 2 = Occasional low-amplitude focal epileptiform discharge in a 20-year-old man, who presented an anti-NMDA_R encephalitis, 3 = Abundant sporadic epileptiform discharges in a 26-year-old man with a history of myoclonic astatic epilepsy, 4 = Frequent PDs in a 75-year-old man with a New-Onset-Refractory-Status-Epilepticus, whose EEG demonstrates intermittent PDs, 5 = Abundant focal occipital PDs without spatial or temporal organization, in a 24-year-old patient with mitochondrial disease.

and blindly scored with EaSiBUSSEs by two neurophysiologists, on time windows of 3 h. Analyses were performed on more than 950 h of EEG records over a total of 103 days. To assess intra- and inter-rater reliability, we measured the intraclass correlation. To assess clinical relevance, we measured the capability of EaSiBUSSEs to identify patients who would present a seizure in the next 24 h. We computed the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve and reported the values of sensitivity and specificity. Analyses were performed using the R software V.3.5.0.

EEG scores were reproducible using EaSiBUSSEs with an excellent intra- and inter-rater consistency of 0.916 [CI 95% 0.896–0.932] and 0.935 [CI 95% 0.902–0.957], respectively. ROC curve revealed also good accuracy at detecting seizure recurrence in the next 24 h for EaSiBUSSEs (AUC = 0.903; CI 95% 0.835–0.972), with a sensitivity of 93.6%, specificity of 72.0%, positive predictive value of 75.9% and negative predictive value of 92.3% when using the cut-off of 5.

Conclusion

Continuous electroencephalography is crucial for monitoring patients admitted in ICU with brain injury. It is particularly

relevant in the management of patients with refractory SE. It is the only way to diagnose persistence or recurrence of NCS or NCSE in anesthetized and curarized patients. Simple and effective EEG scores are needed to summarize the excessive amount of EEG data with large variety of patterns. Several scores or criteria are now available for NCSE diagnosis (Salzburg Criteria), for prognosis (EMSE) and for seizure risk (ZHELPS2B).

Here, we propose a new score to monitor EEG activity after refractory convulsive SE and to quantitatively describe major EEG changes leading to seizure: the EaSiBUSSEs score. We believe that this score is simple to perform and better suited for repeated monitoring of the progressive build-up leading to seizure or SE recurrence, by quantifying the pro-epileptiform potential of several EEG patterns. It may be also useful for other purposes (e.g., therapeutic trials or research on brain injury markers). Using the terminology of SCET, it will facilitate the communication between medical professionals. We validated in a small cohort of patients its accuracy for detecting seizure recurrence. Further studies are needed to examine the performance of EaSiBUSSEs in critically ill patients after convulsive status epilepticus.

A. Hanin, S. Demeret, V.-H. Nguyen-Michel et al.

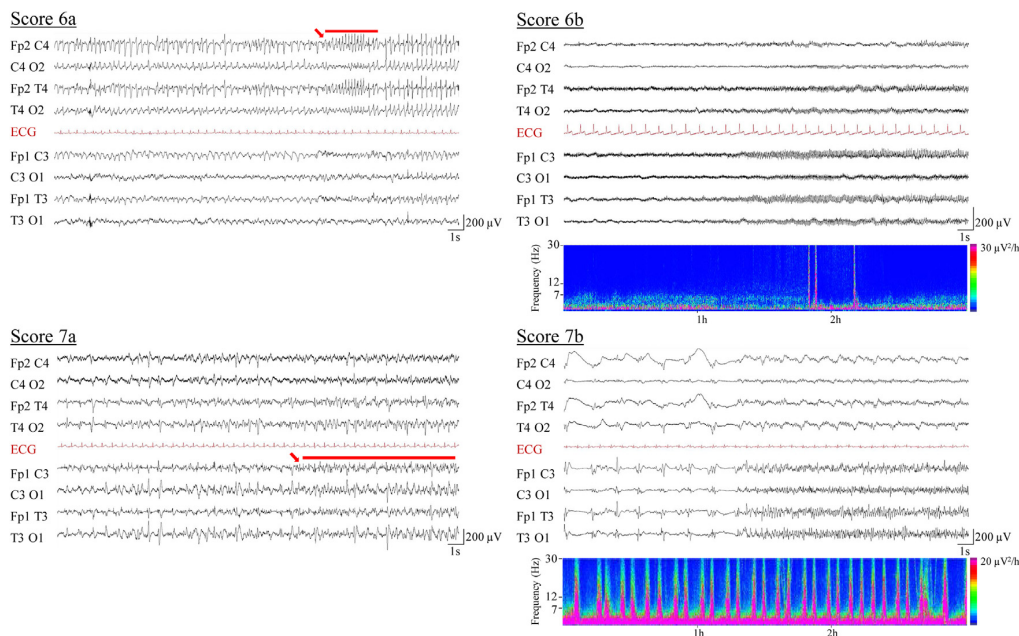


Figure 4 Raw EEG examples of each subscore from 6 to 7.

Each EEG example (8 electrodes, longitudinal bipolar montage, low frequency filter 0.53 Hz, high frequency filter 70 Hz) corresponds to a 30s-epoch extracted from a 3h-analysed period, for display purpose.

Subscore **6a** = Continuous PDs, interrupted by a brief period of rhythmic discharges (red line) in a 58-year-old man with altered mental status, **6b** = A focal electrographic seizure which begins in the left temporal region, without clinical correlate, in a 20-year-old man, who presented an anti-NMDA_R encephalitis. The seizure burden is less than 20% (i.e. 3 seizures of 80s in a 3-h period), as reported by left Compressed Spectral Array (seizures are apparent as increase in power in high frequencies, represented by warmer colors), **7a** = Continuous PDs, interrupted by a longer period of rhythmic discharges (red line), evolving into a seizure, in a 20-year-old man with new-onset-refractory status epilepticus, **7b** = Frequent electrographic seizures arising from the left hemisphere, following LPDs, in a 27-year-old man with new-onset-refractory status epilepticus. The seizure burden is more than 20%, as shown by left Compressed Spectral Array (detection of 30 seizures of 150s in a 3-h period).

Funding source

This work received support from the “Investissements d’avenir” program ANR-10-IAIHU-06, from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FDM20170839111) and from the Fondation Assistance Publique Hôpitaux de Paris (EPIRES – Marie Laure PLV Merchandising).

Conflicts of interest

V.N. reports personal fees from UCB, Liva Nova, and Eisai, outside the submitted work. Other authors report no disclosures.

Acknowledgements

The authors thank Mark Williams (Department of Neurology, Yale School of Medicine, New Haven) for critical reading of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.neucli.2021.01.006>.

References

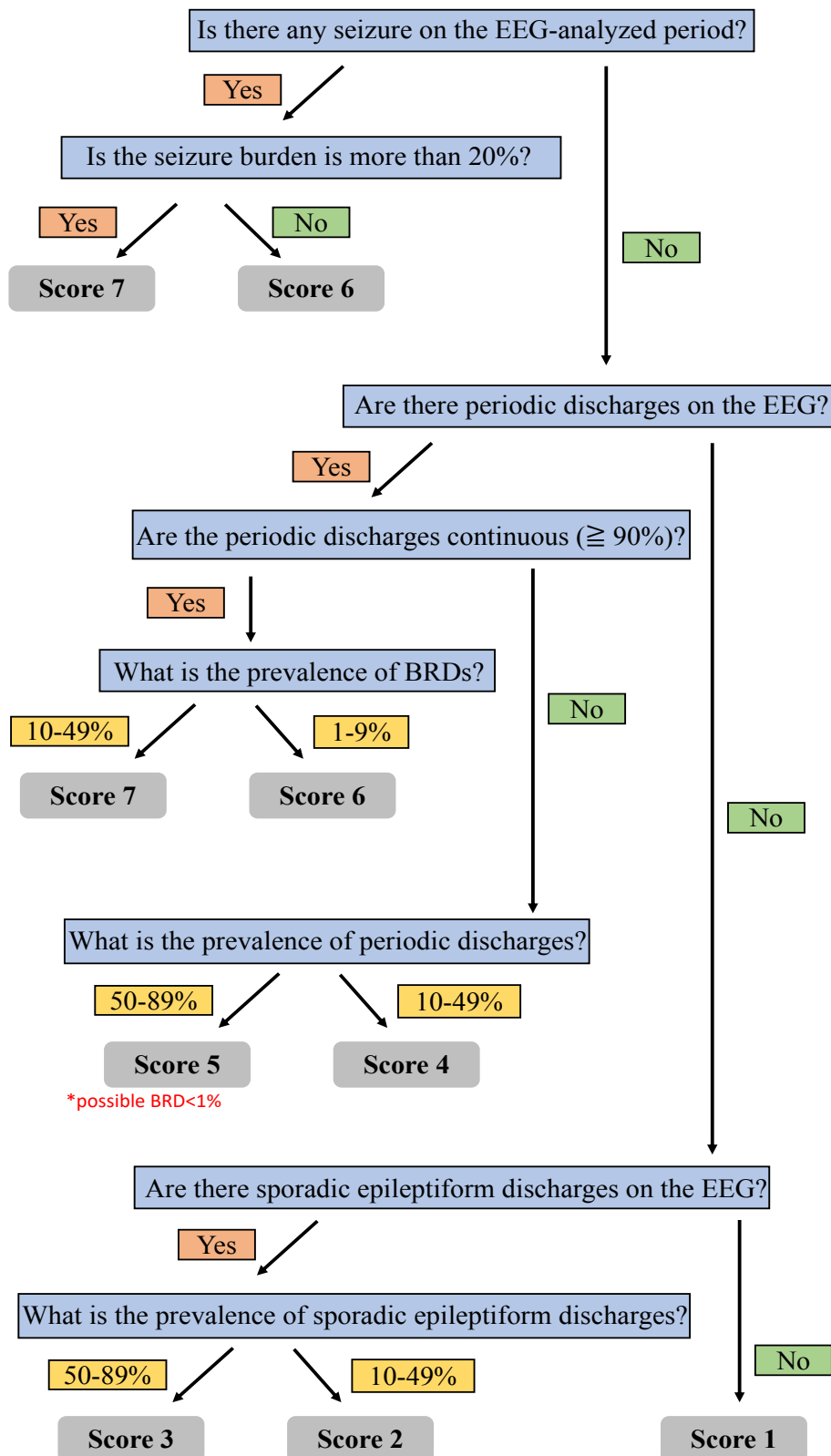
- [1] Alvarez V, Drislane FW, Westover MB, Dworetzky BA, Lee JW. Characteristics and role in outcome prediction of continuous EEG after status epilepticus: a prospective observational cohort. *Epilepsia* 2015;56:933–41.
- [2] Beniczky S, Hirsch LJ, Kaplan PW, Pressler R, Bauer G, Aurlien H, et al. Unified EEG terminology and criteria for nonconvulsive status epilepticus. *Epilepsia* 2013;54 Suppl. 6:28–9.
- [3] Beretta S, Coppo A, Bianchi E, Zanchi C, Carone D, Stabile A, et al. Neurologic outcome of postanoxic refractory status epilepticus after aggressive treatment. *Neurology* 2018;91:e2153–62.
- [4] Brophy GM, Bell R, Claassen J, Alldredge B, Bleck TP, Glauser T, et al. Guidelines for the evaluation and management of status epilepticus. *Neurocrit Care* 2012;17:3–23.
- [5] Carrera E, Claassen J, Oddo M, Emerson RG, Mayer SA, Hirsch LJ. Continuous electroencephalographic monitoring in criti-

- cally ill patients with central nervous system infections. *Arch Neurol* 2008;65:1612–8.
- [6] Chen J, Xie L, Hu Y, Lan X, Jiang L. Nonconvulsive status epilepticus after cessation of convulsive status epilepticus in pediatric intensive care unit patients. *Epilepsy Behav* 2018;82:68–73.
- [7] Claassen J, Mayer SA, Kowalski RG, Emerson RG, Hirsch LJ. Detection of electrographic seizures with continuous EEG monitoring in critically ill patients. *Neurology* 2004;62:1743–8.
- [8] Claassen J, Jetté N, Chum F, Green R, Schmidt M, Choi H, et al. Electrographic seizures and periodic discharges after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2007;69:1356–65.
- [9] Claassen J, Taccone FS, Horn P, Holtkamp M, Stocchetti N, Oddo M, et al. Recommendations on the use of EEG monitoring in critically ill patients: consensus statement from the neurointensive care section of the ESICM. *Intensive Care Med* 2013;39:1337–51.
- [10] De Marchis GM, Pugin D, Meyers E, Velasquez A, Suwatchangkoon S, Park S, et al. Seizure burden in subarachnoid hemorrhage associated with functional and cognitive outcome. *Neurology* 2016;86:253–60.
- [11] Foreman B, Claassen J, Abou Khaled K, Jirsch J, Alschuler DM, Wittman J, et al. Generalized periodic discharges in the critically ill: a case-control study of 200 patients. *Neurology* 2012;79:1951–60.
- [12] Gaspard N, Manganas L, Rampal N, Petroff OAC, Hirsch LJ. Similarity of lateralized rhythmic delta activity to periodic lateralized epileptiform discharges in critically ill patients. *JAMA Neurol* 2013;70:1288–95.
- [13] Giovannini G, Monti G, Tondelli M, Marudi A, Valzania F, Leitinger M, et al. Mortality, morbidity and refractoriness prediction in status epilepticus: comparison of STESS and EMSE scores. *Seizure* 2017;46:31–7.
- [14] Hanin A, Lambrecq V, Denis JA, Imbert-Bismut F, Rucheton B, Lamari F, et al. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus. *Epilepsia* 2020;61:6–18.
- [15] Herman ST, Abend NS, Bleck TP, Chapman KE, Drislane FW, Emerson RG, et al. Consensus statement on continuous EEG in critically ill adults and children, part I: indications. *J Clin Neurophysiol* 2015;32:87–95.
- [16] Hirsch LJ, LaRoche SM, Gaspard N, Gerard E, Svoronos A, Herman ST, et al. American clinical neurophysiology society's standardized critical care EEG terminology: 2012 version. *J Clin Neurophysiol* 2013;30:1–27.
- [17] Jaitly R, Sgro JA, Towne AR, Ko D, DeLorenzo RJ. Prognostic value of EEG monitoring after status epilepticus: a prospective adult study. *J Clin Neurophysiol* 1997;14:326–34.
- [18] Jette N, Claassen J, Emerson RG, Hirsch LJ. Frequency and predictors of nonconvulsive seizures during continuous electroencephalographic monitoring in critically ill children. *Arch Neurol* 2006;63:1750–5.
- [19] Johnson EL, Kaplan PW. Population of the ictal-interictal zone: the significance of periodic and rhythmic activity. *Clin Neurophysiol Pract* 2017;2:107–18.
- [20] Kang BS, Kim DW, Kim KK, Moon HJ, Kim Y-S, Kim HK, et al. Prediction of mortality and functional outcome from status epilepticus and independent external validation of STESS and EMSE scores. *Crit Care* 2016;20:25.
- [21] Kaplan PW, Duckworth J. Confusion and SIRPIDs regress with parenteral lorazepam. *Epileptic Disord Int Epilepsy J Videotape* 2011;13:291–4.
- [22] Koren JP, Herta J, Pirker S, Fürbass F, Hartmann M, Kluge T, et al. Rhythmic and periodic EEG patterns of “ictal-interictal uncertainty” in critically ill neurological patients. *Clin Neurophysiol* 2016;127:1176–81.
- [23] Koren J, Herta J, Drashtak S, Pözl G, Fürbass F, Hartmann M, et al. Early epileptiform discharges and clinical signs predict nonconvulsive status epilepticus on continuous EEG. *Neurocrit Care* 2018;29:388–95.
- [24] Kubota Y, Nakamoto H, Egawa S, Kawamata T. Continuous EEG monitoring in ICU. *J Intensive Care* 2018;6:39.
- [25] Leitinger M, Beniczky S, Rohrer A, Gardella E, Kalss G, Qerama E, et al. Salzburg consensus criteria for non-convulsive status epilepticus—approach to clinical application. *Epilepsy Behav* 2015;49:158–63.
- [26] Leitinger M, Höller Y, Kalss G, Rohrer A, Novak HF, Höfler J, et al. Epidemiology-based mortality score in status epilepticus (EMSE). *Neurocrit Care* 2015;22:273–82.
- [27] Leitinger M, Trinka E, Gardella E, Rohrer A, Kalss G, Qerama E, et al. Diagnostic accuracy of the Salzburg EEG criteria for non-convulsive status epilepticus: a retrospective study. *Lancet Neurol* 2016;15:1054–62.
- [28] Li H-T, Wu T, Lin W-R, Tseng W-EJ, Chang C-W, Cheng M-Y, et al. Clinical correlation and prognostic implication of periodic EEG patterns: a cohort study. *Epilepsy Res* 2017;131:44–50.
- [29] Limotai C, Ingsathit A, Thadanipon K, McEvoy M, Attia J, Thakkestian A. How and whom to monitor for seizures in an ICU: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2019;47:e366–73.
- [30] Moffet EW, Subramaniam T, Hirsch LJ, Gilmore EJ, Lee JW, Rodriguez-Ruiz AA, et al. Validation of the 2HELPS2B seizure risk score in acute brain injury patients. *Neurocrit Care* 2020;33:701–7.
- [31] Nei M, Lee JM, Shanker VL, Sperling MR. The EEG and prognosis in status epilepticus. *Epilepsia* 1999;40:157–63.
- [32] Ong C, Gilmore E, Claassen J, Foreman B, Mayer SA. Impact of prolonged periodic epileptiform discharges on coma prognosis. *Neurocrit Care* 2012;17:39–44.
- [33] Orta DSJ, Chiappa KH, Quiroz AZ, Costello DJ, Cole AJ. Prognostic implications of periodic epileptiform discharges. *Arch Neurol* 2009;66:985–91.
- [34] Pacha MS, Orellana L, Silva E, Ernst G, Pantiu F, Quiroga Narvaez J, et al. Role of EMSE and STESS scores in the outcome evaluation of status epilepticus. *Epilepsy Behav* 2016;64:140–2.
- [35] Payne ET, Zhao XY, Frndova H, McBain K, Sharma R, Hutchinson JS, et al. Seizure burden is independently associated with short term outcome in critically ill children. *Brain* 2014;137:1429–38.
- [36] Pisani F, Copioli C, Di Gioia C, Turco E, Sisti L. Neonatal seizures: relation of ictal video-electroencephalography (EEG) findings with neurodevelopmental outcome. *J Child Neurol* 2008;23:394–8.
- [37] Punia V, Garcia CG, Hantus S. Incidence of recurrent seizures following hospital discharge in patients with LPDs (PLEDs) and nonconvulsive seizures recorded on continuous EEG in the critical care setting. *Epilepsy Behav* 2015;49:250–4.
- [38] Ribeiro A, Singh R, Brunnhuber F. Clinical outcome of generalized periodic epileptiform discharges on first EEG in patients with hypoxic encephalopathy postcardiac arrest. *Epilepsy Behav* 2015;49:268–72.
- [39] Rodriguez Ruiz A, Vlachy J, Lee JW, Gilmore EJ, Ayer T, Haider HA, et al. Association of periodic and rhythmic electroencephalographic patterns with seizures in critically ill patients. *JAMA Neurol* 2017;74:181–8.
- [40] Sainju RK, Manganas LN, Gilmore EJ, Petroff OA, Rampal N, Hirsch LJ, et al. Clinical correlates and prognostic significance of lateralized periodic discharges in patients without acute or progressive brain injury: a case-control study. *J Clin Neurophysiol* 2015;32:495–500.
- [41] Shafi MM, Westover MB, Cole AJ, Kilbride RD, Hoch DB, Cash SS. Absence of early epileptiform abnormalities predicts lack of seizures on continuous EEG. *Neurology* 2012;79:1796–801.
- [42] Snodgrass SM, Tsuburaya K, Ajmone-Marsan C. Clinical significance of periodic lateralized epileptiform discharges:

A. Hanin, S. Demeret, V.-H. Nguyen-Michel et al.

- relationship with status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* 1989;6:159–72.
- [43] Struck AF, Ustun B, Ruiz AR, Lee JW, LaRoche SM, Hirsch LJ, et al. Association of an electroencephalography-based risk score with seizure probability in hospitalized patients. *JAMA Neurol* 2017;74:1419–24.
- [44] Swisher CB, Shah D, Sinha SR, Husain AM. Baseline EEG pattern on continuous ICU EEG monitoring and incidence of seizures. *J Clin Neurophysiol* 2015;32:147–51.
- [45] Topjian AA, Gutierrez-Colina AM, Sanchez SM, Berg RA, Friess SH, Dlugos DJ, et al. Electrographic status epilepticus is associated with mortality and worse short-term outcome in critically ill children. *Crit Care Med* 2013;41:215–23.
- [46] Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, et al. A definition and classification of status epilepticus—report of the ILAE task force on classification of status epilepticus. *Epilepsia* 2015;56:1515–23.
- [47] Trinka E, Kälviäinen R. 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. *Seizure* 2017;44:65–73.
- [48] Walsh JM, Brenner RP. Periodic lateralized epileptiform discharges—long-term outcome in adults. *Epilepsia* 1987;28:533–6.
- [49] Westover MB, Shafi MM, Bianchi MT, Moura LMVR, O'Rourke D, Rosenthal ES, et al. The probability of seizures during EEG monitoring in critically ill adults. *Clin Neurophysiol* 2015;126:463–71.
- [50] Yoo JY, Rampal N, Petroff OA, Hirsch LJ, Gaspard N. Brief potentially ictal rhythmic discharges in critically ill adults. *JAMA Neurol* 2014;71:454–62.
- [51] Zafar SF, Subramaniam T, Osman G, Herlopian A, Struck AF. Electrographic seizures and ictal-interictal continuum (IIC) patterns in critically ill patients. *Epilepsy Behav* 2020;106:107037.
- [52] Zeiler SR, Turtzo LC, Kaplan PW. SPECT-negative SIRPIDs argues against treatment as seizures. *J Clin Neurophysiol* 2011;28:493–6.

Supplementary Fig.1: Decision-making tree for EaSiBUSSEs



3. Une approche multimodale pour optimiser le suivi des patients et la prédiction du risque de récurrence de crise après un état de mal épileptique réfractaire

3.1. Introduction

Des crises d'épilepsies non-convulsives et un EME non convulsif surviennent fréquemment chez les patients admis en réanimation pour un EME convulsif (respectivement dans 33,5% et 20,2% des cas) (Limotai et al. 2019). Comme nous l'avons vu précédemment, les crises peuvent être précédées par des changements visibles à l'EEG, qui fluctuent dans le temps et dans les régions cérébrales atteintes. La surveillance EEG continue est actuellement le seul moyen de suivre l'évolution, au cours du temps, d'un patient admis en réanimation pour un EME réfractaire, et de diagnostiquer la persistance ou la récurrence des crises chez des patients anesthésiés et curarisés. La récurrence des crises expose les patients au risque d'excitotoxicité et de lésions neuronales, qui peuvent être reflétées par l'augmentation des concentrations sériques de marqueurs biochimiques tels que la Neuron Specific Enolase (NSE) ou la protéine S100-bêta.

Dans ce travail, nous avons évalué (i) la capacité de la NSE et de la protéine S100-bêta à refléter les anomalies électroencéphalographiques qui précèdent la survenue des crises et (ii) leur capacité à prédire la récurrence des crises après un EME réfractaire.

3.2. Démarche expérimentale

Nous avons conduit cette étude sur une cohorte de patients admis dans l'Unité de Neuroréanimation de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière pour un EME réfractaire, entre décembre 2017 et juillet 2019. Les patients inclus dans cette étude ont bénéficié au minimum de 3 jours de surveillance EEG continue, associés à des dosages sériques quotidiens de la NSE et de la protéine S100-bêta.

Les tracés électroencéphalographiques ont été relus et scorés, chaque jour, pendant les 9 heures qui précédaient le prélèvement sanguin, à l'aide de deux outils quantitatifs permettant d'évaluer le risque de récurrence de crise : le score 2HELPS2B et le score EaSiBUSSEs.

Les concentrations sériques de NSE et de la protéine S100-bêta ont été mesurées respectivement par une méthode immunofluorimétrique (Kryptor®, Brahms) et une méthode immunométrique en sandwich (Modular®E170, Roche Diagnostics).

Nous avons eu recours à un modèle linéaire mixte pour étudier les corrélations entre les concentrations sériques des biomarqueurs, les scores EEG et leur évolution au cours du temps. La capacité des biomarqueurs à prédire le risque de récurrence de crise a été évaluée à l'aide d'une courbe ROC.

3.3. Résultats

Onze patients ont été inclus pour cette étude. Ils ont eu en moyenne 14 jours de surveillance EEG continue, concomitants aux dosages sériques de la NSE et de la protéine S100-bêta. Les corrélations ont été effectuées sur 103 jours d'analyse. Il s'agit des mêmes patients que ceux inclus pour l'étude précédente (Article 2).

Nous avons premièrement observé que les concentrations sériques de NSE corrélaient positivement avec le score 2HELPS2B ($p = 0,0017$) et le score EaSiBUSSEs ($p = 0,0066$). De plus, nous avons observé une dynamique d'évolution similaire pour les concentrations sériques de NSE et le score EaSiBUSSEs ($p = 0,023$), soulignant l'intérêt de la NSE pour le suivi des patients admis en réanimation pour un EME. En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation des concentrations sériques de la protéine S100-bêta avec les deux scores EEG.

Les concentrations sériques de NSE et de la protéine S100-bêta ne présentaient qu'une capacité modérée à prédire le risque de récurrence de crise à 24 heures avec respectivement une AUC de 0,608 pour la NSE et une AUC de 0,592 pour la protéine S100-bêta. Cependant, nous avons pu identifier deux seuils de NSE ayant un intérêt pour la prédiction du risque de crise :

- Plus de 71% des patients ayant une concentration sérique de NSE supérieure à 17 ng/mL ont présenté une récurrence de crise dans les 24 heures suivant le prélèvement sanguin.
- 80% des patients dont les concentrations de NSE ont augmenté de plus de 15% entre deux mesures successives ont présenté une récurrence de crise lors du troisième jour de suivi.

Cette étude souligne l'intérêt de la NSE comme un biomarqueur des anomalies électroencéphalographiques et pour prédire le risque de récurrence de crise dans les suites d'un EME réfractaire.

Ce travail a été soumis pour publication dans le journal *European Journal of Neurology* et fait l'objet d'une demande de modifications mineures.

3.4. Article 3 : Serum Neuron Specific Enolase: a new tool for seizure risk monitoring after status epilepticus.

Short running title: Neuron Specific Enolase in status epilepticus

Authors:

Aurélié Hanin, PharmD^{1,2}, Sophie Demeret, MD³, Jérôme Alexandre Denis, PharmD, PhD^{4,5}, Vi-Huong Nguyen-Michel, MD², Benjamin Rohaut, MD, PhD^{1,3,4}, Clémence Marois, MD^{3,6}, Françoise Imbert-Bismut, PharmD, PhD⁷, Dominique Bonnefont-Rousselot, PharmD, PhD^{7,8}, Pierre Levy, MD⁹, Vincent Navarro, MD, PhD^{1,2,4,10*}, Virginie Lambrecq, MD, PhD^{1,2,4*}

* These authors contributed equally to the manuscript.

¹Sorbonne Université, Paris Brain Institute – Institut du Cerveau, ICM, INSERM U1127, CNRS UMR 7225, Paris France

²AP-HP, Clinical Neurophysiology Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

³AP-HP, Neuro-Intensive care Unit, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

⁴Sorbonne Université, Paris France

⁵AP-HP, Endocrine and Oncological Biochemistry Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

⁶Groupe de Recherche Clinique en REanimation et Soins intensifs du Patient en Insuffisance Respiratoire aiguE (GRC-RESPIRE), Sorbonne Université

⁷AP-HP, Metabolic Biochemistry Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

⁸Unité des Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), INSERM U1267, CNRS UMR 8258, Université de Paris, Paris, France

⁹AP-HP, Public Health Department, Tenon Hospital, Paris, France

¹⁰AP-HP, Center of Reference for Rare Epilepsies, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

Correspondence to: Vincent Navarro

Affiliation: Sorbonne Université, Paris Brain Institute – Institut du Cerveau, ICM, Inserm U1127, CNRS UMR 7225, Paris France and AP-HP, Clinical Neurophysiology Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

Address/City/Country: 47-83 Boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, France

Telephone: + 33 1 42 16 18 11

Email: vincent.navarro@aphp.fr

Number of words in the abstract: 200 (max 250)

Number of words in the body of the manuscript: 1486 (max 1500)

Number of figures: 1

Number of color figures: 1

Number of tables: 1

Supplementary materiel: Supplementary.Fig1

Keywords: Biomarkers, EEG, Neuron Specific Enolase, Seizure prediction, Status epilepticus

Summary

Objective: There is a need for accurate biomarkers to monitor EEG activity and assess seizure risk in patients with acute brain injury. Seizure recurrence may lead to cellular alterations and subsequent neurological sequels. We investigated whether Neuron Specific Enolase (NSE) and S100-beta (S100B), brain injury biomarkers, can reflect EEG activity and help to evaluate the seizure risk.

Methods: We included 11 patients, admitted to an intensive care unit for refractory status epilepticus, who underwent a minimum of 3 days of continuous EEG, concomitantly with daily serum NSE and S100B assays.

We investigated on 103 days the relationships between serum NSE and S100B levels and two EEG scores to monitor the seizure risk. We looked for biochemical biomarker thresholds able to predict seizure recurrence.

Results: Only NSE levels positively correlated with EEG scores. Similar temporal dynamics were observed for the time courses of EEG scores and NSE levels. NSE levels above 17 ng/mL were associated with seizure in 71% of patients. An increase of more than 15% of NSE levels was associated with seizure recurrence in 80% of patients.

Conclusions: Our study highlights the potential of NSE as a biomarker of EEG activity and to assess risk of seizure recurrence.

Abbreviations:

cEEG = continuous electroencephalography; EaSiBUSSEs = EEG-based seizure build-up score in status epilepticus; ICU = intensive care unit; LMM = linear mixed model; NSE = Neuron Specific Enolase; ROC = receiving operating characteristics; S100B = S100-beta protein; SE = status epilepticus

Introduction

Status epilepticus (SE) is a life-threatening prolonged epileptic seizure.(1) Around 25% of SE are refractory to adequate antiepileptic drugs and require anesthetics. Non-convulsive seizures and non-convulsive SE occur frequently after a convulsive SE (33.5% and 20.2% respectively).(2)

Seizures may be preceded by electroencephalography (EEG) changes, which fluctuate both spatially and temporally. Currently, continuous EEG (cEEG) is the only way to monitor patients admitted after refractory SE. It allows the diagnosis of the persistence or recurrence of non-convulsive seizures in anesthetized and curarized patients. The management of refractory SE without cEEG monitoring exposes the patients to complications induced by unnecessary aggressive sedative treatments and brain lesions related to untreated SE.(3) SE recurrence may lead to cellular alterations (e.g. neuronal loss and glial activation) that could induce subsequent neurologic sequelae and even death.(4) Neuron Specific Enolase (NSE) and S100-beta (S100B) protein, two proteins able to reflect brain injury, have been proposed as seizures or SE biomarkers.(5) NSE is present in neurons and neuroendocrine cells. An increase of serum NSE levels was first reported after an isolated seizure, with a peak level occurring within six to twelve hours after seizure onset.(6–9) Increased serum NSE levels were reported in patients with sustained SE.(10,11) S100B is present in high concentrations in glial cells and Schwann cells. S100B peaked in serum within one to six hours after an isolated seizure, and was not previously studied in human SE.(9)

Here, we assessed whether NSE and S100B could reflect the EEG activity by investigating the relationships between EEG scores, able to monitor the seizure risk, and serum NSE and S100B levels. Secondly, we assessed if serum NSE and S100B levels could be used to evaluate the seizure risk recurrence after SE and if we could propose biological thresholds for their clinical use.

Methods

Study design, setting and participants

We prospectively enrolled consecutive patients admitted in the Neuro intensive care unit (ICU) of Pitié-Salpêtrière Hospital for refractory SE, between December 2017 and July 2019 and who underwent at least 3 days of cEEG recording, concomitantly with daily blood analysis. Patients with post-anoxic SE and induced burst-suppression EEG pattern were excluded.

The protocol was approved by the local ethic committee (2012, CPP-Paris-VI). Patients or relatives were informed and provided their consent.

Seizure risk assessment with EEG analyses

EEGs were independently and blindly scored with two quantitative tools (2HELPS2B and EaSiBUSSEs) developed to monitor the seizure risk.(12–14) The 2HELPS2B score (range 0-7) is calculated, for a given time period, by a point system using one clinical and five EEG variables.(12) It was shown to efficiently assess the seizure risk in critically ill patients.(12) The EaSiBUSSEs score (range 1-7) is based on the morphology and the prevalence of EEG patterns and tailored to repeatedly monitor the progressive build-up leading to seizure recurrence.(14)

EEG were scored every day within 3 consecutive time windows of 3 hours, before the blood draw (Fig.1A). The mean of the 3 scores for each day was calculated, allowing to score EEG for 9 hours before blood sample. This time-window was chosen because NSE levels reach a peak between six and twelve hours after seizure onset.

Serum samples and assays

Blood samples were drawn daily at 6 am. Blood was centrifuged at 3500 rpm for 10 min. Hemolytic samples (hemoglobin concentration up to 47 mg/dL) were excluded. Serum NSE and S100B assays were performed daily using respectively immunofluorimetric assays and electrochemiluminometric sandwich immunoassays (Kryptor® and Modular®E170, Roche Diagnostics). The lowest detections were 0.8 ng/mL for NSE and 0.005 ng/mL for S100B. The coefficients of variation were found to be lower than 5% for all controls used.

Statistical analysis

To evaluate the relationship between serum NSE or S100B levels and EEG scores, we computed a linear mixed model (LMM) using successively NSE or S100B levels as the dependent variable; 2HELPS2B or EaSiBUSSEs as the fixed effect explanatory variables; and patients, time and the second biological variable (successively S100B or NSE) as random effects. The levels of correlation were obtained with Spearman analysis.

To assess the ability of biological markers to identify patients who would present a seizure in the next 24 hours, we computed the area under the receiver operating characteristics (ROC) curve and reported the values of sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for the best cut-off defined accordingly to the Youden's index.(15)

All statistical tests were two-sided with a type I error rate of 5%. Analyses were performed using the R software V.3.5.0.

Data availability

All anonymized data are available on request.

Results

We screened 17 consecutive patients who were admitted to the Neuro-ICU for refractory SE and underwent long-term cEEG recording. We excluded 5 patients because their EEG was monitored for less than 3 days and 1 patient due to an induced burst-suppression EEG pattern. We included the 11 remaining patients for a total of 103 days with both cEEG recording (more than 950 hours of EEG records) and daily NSE and S100B assays.

Demographic and clinical data of the population and etiologies of SE are shown in Table1.

1. Association between EEG scores and serum NSE or S100B levels

Patients underwent a mean of 14 days of cEEG monitoring. Serum NSE levels positively correlated with 2HELPS2B ($\rho=0.31$; $p=0.0017$; $p=0.10$ once corrected for patient, time and S100B effect; Fig.1B) and EaSiBUSSEs scores ($\rho=0.27$; $p=0.0066$; $p=0.030$ once corrected for patient, time and S100B effects; Fig.1C). Conversely, S100B levels did not correlate with either 2HELPS2B ($\rho=-0.026$; $p=0.80$; Fig.1D) or EaSiBUSSEs ($\rho=-0.048$; $p=0.64$; Fig.1E). A closer look at the time courses of serum NSE levels and EaSiBUSSEs score showed a correlation ($\rho 0.24$; $p=0.023$; $p=0.091$ once corrected for patient effect), regardless of SE etiology (see Supplementary.Fig1 for details of the etiologies). No correlation was found between the evolution of NSE levels and 2HELPS2B ($p=0.66$).

2. Biological markers to assess the seizure risk

Serum NSE and S100B levels were able to assess the seizure risk with a mild discrimination (AUC=0.608; 95% CI 0.481-0.736 and AUC=0.592; 95% CI 0.471-0.712, respectively). Nevertheless, NSE levels above 17 ng/mL were associated with a higher risk of seizures (PPV=71.1%, NPV=57.1%, Se=60.0%, Sp=68.6%), along with an increase of 15% between two successive measures (PPV=80.0%, NPV=50.0%, Se=32.0%, Sp=89.5%).

We did not find efficient thresholds to assess the seizure risk with S100B (PPV<50%).

Discussion

Serum NSE levels correlated well with both EEG scores predicting the risk of seizure recurrence: low NSE levels were associated with EEG epochs including rare or no sporadic epileptiform discharges, whereas high NSE levels were associated with epochs including frequent to continuous periodic discharges and seizures. Increased serum NSE levels was previously reported after isolated seizures, with a peak occurring between six and twelve hours after seizure onset.(6–9) Our results are in agreement with previous publications. However, the underlying mechanisms are still not well known: increased serum NSE levels might be related to neuronal death or opening of the blood-brain barrier related to seizures, or both.

The time course of serum NSE levels correlated well with that of the EaSiBUSSEs, regardless of the SE etiology. The correlations were lower for NSE and 2HELPS2B. This could be explained by a lower range of variation within each patient for 2HELPS2B score, possibly because the prevalence of EEG patterns (i.e. sporadic epileptiform discharges, periodic discharges) is not accounted for this score.

Higher NSE levels as well as increased NSE levels between two successive measures were associated with a higher risk of seizure. We found notably that more than 70% of patients with NSE above 17 ng/mL and 80% of patients for whom NSE increased of more than 15% between two successive measures would present seizures in the next 24 hours. Therefore, we assume that an NSE level kinetics could be relevant to identify periods of uncontrolled SE.

Our study highlights the potential of NSE as a biomarker reflecting EEG activity and its interest to assess the seizure risk. It is a simple effective bed-side investigation, that does not require interpretation expertise.

We found no correlation between S100B levels and EEG scores. We can make the hypothesis that either the short half-time of this protein is not appropriate for daily evaluation or that glial cell activation is delayed and inconstant.

Although our population sample was small with various SE etiologies, this is the first study which performed daily NSE and S100B measurements and a detailed analysis of cEEG recording with two EEG scores for long-term monitoring patients (14 days in average per patient and a total of 103 days).

Monitoring using multiple modalities is increasingly recommended to monitor patients in ICU and to assess the pathophysiological pathways involved in secondary brain events. A multimodality monitoring with cEEG and NSE assays might have an added value to assess the seizure risk. Further studies are needed to confirm the interest of NSE in SE follow-up and to assess the performance of a multimodality monitoring in critically ill patients after SE as well as in other acute brain injury patients.

Acknowledgements

The authors thank Mark Williams (Department of Neurology, Yale School of Medicine, New Haven) for critical reading of the manuscript.

This work received support from the “Investissements d’avenir” program ANR-10-IAIHU-06, from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FDM20170839111) and from the Fondation Assitance Publique-Hôpitaux de Paris (EPIRES- Marie-Laure PLV Merchandising).

Conflicts of Interest

Vincent Navarro reports personal fees from UCB Pharma, Eisai, GW Pharma and LivaNova, outside the submitted work.

Others authors report no disclosures.

Author contributions

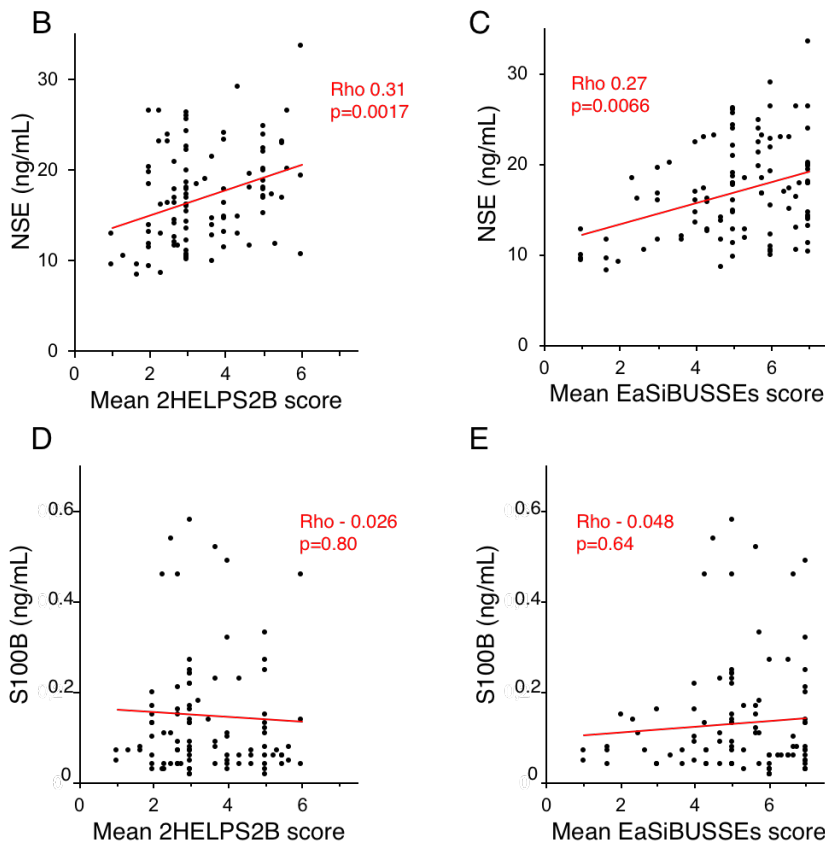
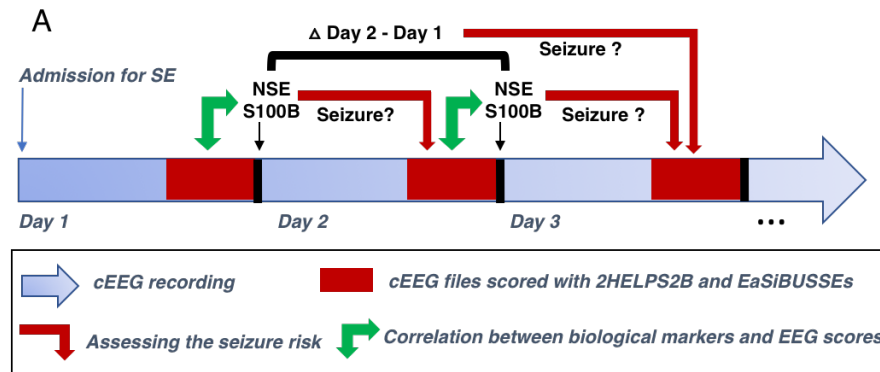
Name	Contribution
Aurélie Hanin	Conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, validation, visualization, writing original draft preparation
Sophie Demeret	Conceptualization, investigation, methodology, project administration, supervision, validation, writing original draft preparation
Jérôme Alexandre Denis	Data curation, investigation, methodology, validation, visualization, writing original draft preparation
Vi-Huong Nguyen-Michel	Investigation, validation, writing original draft preparation
Benjamin Rohaut	Investigation, validation, writing original draft preparation
Clémence Marois	Investigation, validation, writing original draft preparation
Françoise Imbert-Bismut	Data curation, investigation, methodology, validation, visualization, writing original draft preparation
Dominique Bonnefont-Rousselot	Investigation, project administration, supervision, validation, writing original draft preparation
Pierre Levy	Data curation, formal analysis, visualization
Vincent Navarro	Conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, supervision, validation, visualization, writing original draft preparation
Virginie Lambrecq	Conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, project administration, supervision, validation, visualization, writing original draft preparation

References

1. Trinka E, Kälviäinen R. 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. *Seizure*. 2017 Jan;44:65–73.
2. Limotai C, Ingsathit A, Thadanipon K, McEvoy M, Attia J, Thakkinstian A. How and Whom to Monitor for Seizures in an ICU: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Care Med*. 2019;47(4):e366–73.
3. Marawar R, Basha M, Mahulikar A, Desai A, Suchdev K, Shah A. Updates in Refractory Status Epilepticus. *Crit Care Res Pract*. 2018;2018:9768949.
4. Rossetti AO, Logroscino G, Bromfield EB. A clinical score for prognosis of status epilepticus in adults. *Neurology*. 2006 Jun 13;66(11):1736–8.
5. Hanin A, Lambrecq V, Denis JA, Imbert-Bismut F, Rucheton B, Lamari F, et al. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus. *Epilepsia*. 2020 Jan;61(1):6–18.
6. Royds JA, Davies-Jones GA, Lewtas NA, Timperley WR, Taylor CB. Enolase isoenzymes in the cerebrospinal fluid of patients with diseases of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1983 Nov;46(11):1031–6.
7. Rabinowicz AL, Correale J, Boutros RB, Couldwell WT, Henderson CW, DeGiorgio CM. Neuron-specific enolase is increased after single seizures during inpatient video/EEG monitoring. *Epilepsia*. 1996 Feb;37(2):122–5.
8. Tumani H, Otto M, Gefeller O, Wiltfang J, Herrendorf G, Mogge S, et al. Kinetics of serum neuron-specific enolase and prolactin in patients after single epileptic seizures. *Epilepsia*. 1999 Jun;40(6):713–8.
9. Palmio J, Keränen T, Alapirtti T, Hulkkonen J, Mäkinen R, Holm P, et al. Elevated serum neuron-specific enolase in patients with temporal lobe epilepsy: A video–EEG study. *Epilepsy Research*. 2008 Oct;81(2–3):155–60.
10. DeGiorgio CM, Correale JD, Gott PS, Ginsburg DL, Bracht KA, Smith T, et al. Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology*. 1995 Jun;45(6):1134–7.
11. DeGiorgio CM, Gott PS, Rabinowicz AL, Heck CN, Smith TD, Correale JD. Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus. *Epilepsia*. 1996 Jul;37(7):606–9.
12. Struck AF, Ustun B, Ruiz AR, Lee JW, LaRoche SM, Hirsch LJ, et al. Association of an Electroencephalography-Based Risk Score With Seizure Probability in Hospitalized Patients. *JAMA Neurol*. 2017 01;74(12):1419–24.

13. Moffet EW, Subramaniam T, Hirsch LJ, Gilmore EJ, Lee JW, Rodriguez-Ruiz AA, et al. Validation of the 2HELPS2B Seizure Risk Score in Acute Brain Injury Patients. *Neurocrit Care*. 2020 Dec;33(3):701–7.
14. Hanin A, Demeret S, Nguyen-Michel V-H, Lambrecq V, Navarro V. Continuous EEG monitoring in the follow-up of convulsive status epilepticus patients: A proposal and preliminary validation of an EEG-based seizure build-up score (EaSiBUSSEs). *Neurophysiol Clin*. 2021 Mar;51(2):101–10.
15. Fluss R, Faraggi D, Reiser B. Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point. *Biom J*. 2005 Aug;47(4):458–72.

Fig.1: Correlations between Neuron Specific Enolase, S100B and the EEG scores and their assessing performance.



The Fig.1A represents the analysis protocol for each patient.

The Fig.1B and 1C show the relations between serum NSE levels and 2HELPS2B and EaSiBUSSEs, respectively. The Fig.1D and 1E show the relations between serum S100B levels and 2HELPS2B and EaSiBUSSEs, respectively. The correlations were assessed with the Spearman test.

Table1: Clinical characteristics of the study population.

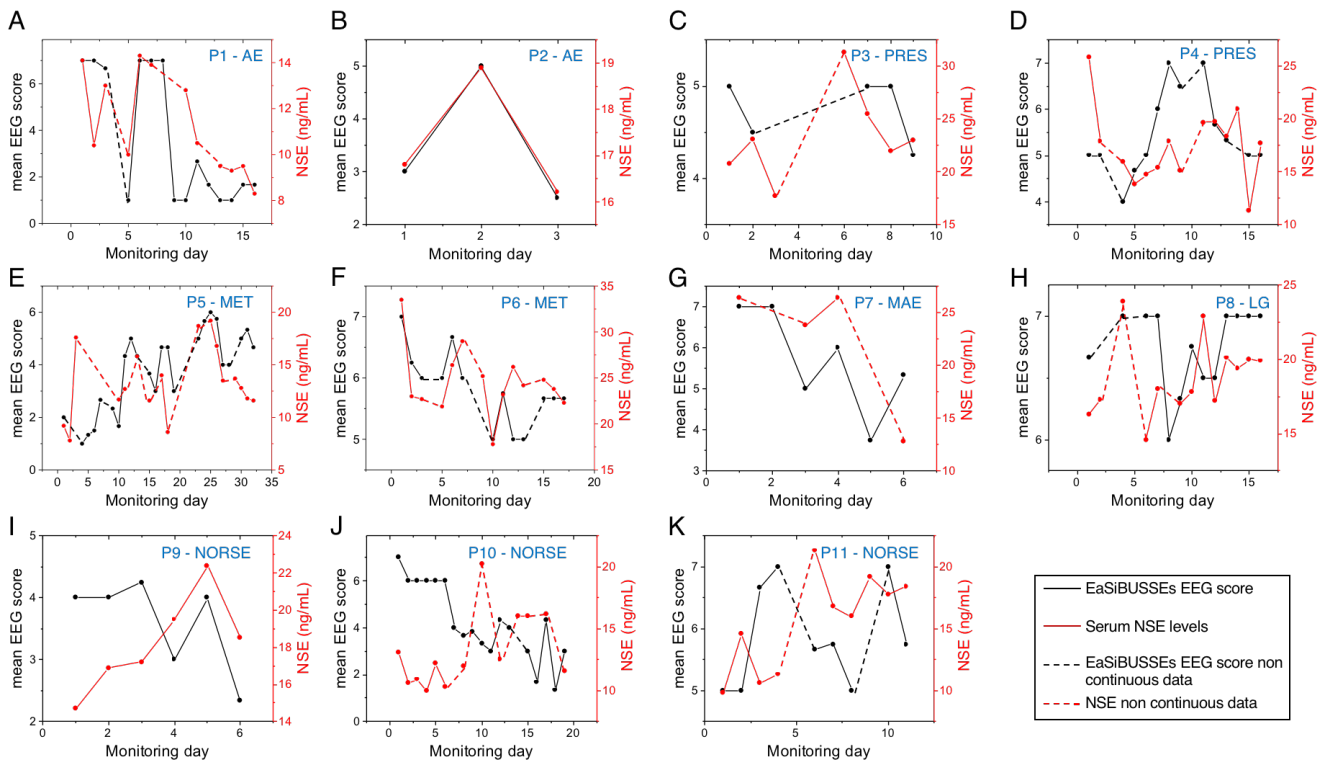
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Mean or % ± sd
Age (years)	20	54	52	68	58	24	26	27	75	27	20	41.0 ± 20.6
Previous epilepsy	No	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	No	27%
SE etiology	NMDA encephalitis	Seronegative autoimmune encephalitis	PRES	PRES	Metabolic	Metabolic	Myoclonic astatic epilepsy	Lennox-Gastaut syndrome	NORSE	NORSE	NORSE	-
SE clinical subtype	Focal	Focal	Focal	Focal	Focal	Focal	Focal	Focal	Focal	Generalized	Generalized	-
Intubated	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	82%
Anesthetics	FOS MDZ PPF	MDZ PB PPF	FOS PPF	MDZ PPF	KET MDZ PPF TP	FOS PHE	KET MDZ	KET MDZ PPF	MDZ	FOS KET MDZ PPF	FOS KET MDZ PPF	-
AEDs	CLO CLZ LVT	CLO LCS LVT PHB	CLO LCS LVT PGB	LCS LVT	CBZ LCS LVT TPM	CBZ CLO CLZ LTG* LVT PER PHB PGB VPA*	CLO* LTG* LVT RFM* TPM* VPA*	CBZ* CLO LTG* STP* TPM* VPA	LCS LVT	CLO LCS LVT PER TPM	LVT PER PHB TPM	-
IgIV or corticoids	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	55%
SE duration before inclusion (days)	0	21	14	35	34	1	3	13	10	9	22	14.7 ± 12.1
Duration of monitoring (days)	16	3	9	16	32	17	6	16	6	19	11	13.7 ± 8.08
Duration of monitoring with NSE/S100B assays (days)	12	3	5	13	14	13	4	12	6	12	9	9.4 ± 4.1
Highest NSE value (ng/mL)	14.3	18.9	25.5	25.9	19.2	33.5	26.4	23.9	22.4	20.2	21.3	22.9 ± 5.05
Highest S100B value (ng/mL)	0.21	0.16	1.62	0.27	0.15	0.24	0.04	0.13	0.16	0.07	0.52	0.32 ± 0.45

Data for the eleven patients are represented with mean or percentages and standard deviation.

Abbreviations: AEDs = antiepileptic drugs; CBZ = Carbamazepine; CLO = Clobazam; CLZ = Clonazepam; FOS = Fosphenytoin; IgIV = intravenous immunoglobulin; KET = Ketamine; LCS = Lacosamide; LTG = Lamotrigine; LVT = Levetiracetam; MDZ = Midazolam; NORSE = New-Onset Refractory Status Epilepticus; NSE = Neuron Specific Enolase; PB = Pentobarbital; PER = Perampanel; PGB = Pregabalin; PHB = Phenobarbital; PHE = Phenytoin; PPF = Propofol; PRES = Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome; RFM = Rufinamide; S100B = S100-beta; SE = Status Epilepticus STP = Stiripentol; TP = Thiopental; TPM = Topiramate; VPA = Valproate

*AEDs: usual treatment

Supplementary.Fig1: Time course of EEG-based seizure build-up score in status epilepticus (EaSiBUSSEs) and NSE levels for 11 patients.



The time courses of serum NSE levels is represented with red lines while the time course of EaSiBUSSEs score is represented with black lines. The dotted lines represent non-continuous data. We observed a very good correlation for 8 patients (A-H). A and B represent the time courses for 2 patients with autoimmune encephalitis (AE), C and D the time courses for 2 patients with a posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES), E and F the time courses for 2 patients with metabolic SE (MET), G and H the time courses for 2 patients who had previously been diagnosed with epilepsy (myoclonic astatic epilepsy, MAE and Lennox-Gastaut, LG). The correlation was weaker for 3 patients with New-Onset Refractory Status Epilepticus (NORSE) for whom no etiology had been found after careful evaluation (I-K).

Partie 2. De nouveaux biomarqueurs des états de mal épileptiques

1. Une approche ciblée : le métabolisme du cholestérol intracérébral

1.1. Introduction

Les EME peuvent s'accompagner de nombreux changements cellulaires et moléculaires, comme une mort neuronale, de l'inflammation et un changement de perméabilité de la BHE. Cependant, d'autres mécanismes physiologiques pourraient être altérés lors d'un EME et pourraient expliquer une partie de sa toxicité sur le cerveau. Il a notamment été décrit que l'inhibition de l'enzyme CYP46A1, jouant un rôle clé dans l'homéostasie du cholestérol cérébral, provoquait, dans les neurones de l'hippocampe de souris, une accumulation de cholestérol, une mort neuronale et des anomalies épileptiques, similaires à celles observées à la suite d'un EME (Chali et al. 2015). En revanche, l'impact de l'EME sur l'homéostasie du cholestérol n'a jamais été évalué chez l'Homme et les études faites dans des modèles murins ont montré des résultats discordants (Kim et al. 2010; Ong et al. 2010; Chali et al. 2019).

Dans ce travail, nous avons évalué, chez l'Homme et dans un modèle murin, l'effet de l'EME sur l'homéostasie du cholestérol cérébral et périphérique, et nous avons étudié les interactions entre ces deux métabolismes.

1.2. Démarche expérimentale

Nous avons inclus des patients en EME, des patients épileptiques sans EME et des patients contrôles sans antécédent de maladies neurologiques ou psychiatriques, au sein des réanimations et du département de Neurologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière. Nous avons collecté chez ces patients des prélèvements de sang et de LCR. Parallèlement, nous avons collecté des tissus cérébraux de patients décédés des suites d'un EME et de patients contrôles, auprès du département de Neuropathologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière. Nous avons également travaillé sur un modèle murin d'EME induit par une injection intrahippocampique de kainate et prélevé les hippocampes des animaux en EME et des animaux contrôles.

Grâce à une collaboration étroite avec le département de Biochimie métabolique de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, nous avons dosé, sur ces échantillons humains et murins, des marqueurs lipidiques par méthode enzymatique et des précurseurs de synthèse et dérivés du cholestérol par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Nous avons recherché la présence de l'enzyme CYP46A1 par western blot et immunohistochimie.

Les concentrations des biomarqueurs lipidiques ont été comparées entre les différents groupes à l'aide de tests de Student ou de Mann Whitney selon la distribution des valeurs.

1.3. Résultats

Nous avons inclus pour cette étude 63 patients en EME et 87 patients témoins, dont 44 patients épileptiques et 43 patients contrôles. Des tissus cérébraux post-mortem ont été collectés chez 8 patients décédés d'un EME et 8 patients témoins.

Nous avons mis en évidence, dans l'hippocampe murin injecté par le kaïnate et siège de l'EME : (i) une diminution du 24-hydroxycholestérol (24-OHc) dans les 24 heures suivant le début de l'EME et (ii) une augmentation secondaire des concentrations de desmostérol (précurseur clé de la synthèse du cholestérol) puis de cholestérol, débutant 3 jours après l'injection de kaïnate, soit au cours de la période latente post-EME. La diminution des concentrations de 24-OHc a été retrouvée pour la première fois chez l'Homme au niveau plasmatique ainsi que dans les tissus cérébraux humains post-mortem. En revanche, aucune différence d'expression de la CYP46A1 n'a pu être mise en évidence, suggérant que l'enzyme CYP46A1 serait toujours présente mais non fonctionnelle. Nous avons également pu mettre en évidence, chez l'Homme, une augmentation de la synthèse du cholestérol : (i) au niveau cérébral à travers une hausse du desmostérol et du cholestérol dans le LCR et les tissus post-mortem et (ii) au niveau périphérique à travers une élévation des concentrations de lanostérol et de dihydrolanostérol sériques. L'augmentation de synthèse du cholestérol est à mettre en relation avec des changements du bilan lipidique périphérique : (i) une moindre estérification du cholestérol libre limitant son élimination au niveau hépatique et (ii) une augmentation des concentrations de l'apolipoprotéine E favorisant un transport et un stockage en excès du cholestérol dans les tissus périphériques, voire au niveau cérébral.

Cette étude ouvre la voie à un traitement neuroprotecteur par statines pour diminuer l'accumulation du cholestérol dans les neurones, à la suite d'un EME et prévenir les lésions cérébrales et séquelles neurologiques secondaires.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal *Neurobiology of Disease*. Les résultats ont été présentés sous la forme d'un poster lors du congrès de la *Society for Neurosciences* 2019, à Chicago, et ont fait l'objet d'un article grand public (Annexe 1).

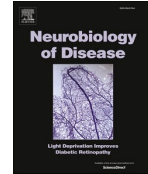
1.4. Article 4 : Disturbances of brain cholesterol metabolism : a new excitotoxic process associated with status epilepticus. Neurobiology of Disease.

Neurobiology of Disease 154 (2021) 105346



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi

Disturbances of brain cholesterol metabolism: A new excitotoxic process associated with status epilepticus

Aurélien Hanin^a, Paul Baudin^a, Sophie Demeret^b, Delphine Roussel^a, Sarah Lecas^a, Elisa Teyssou^a, Maria Damiano^c, David Luis^a, Virginie Lambrecq^{a,c,d}, Valerio Frazzini^{a,c}, Maxens Decavèle^{e,f}, Isabelle Plu^{d,g}, Dominique Bonnefont-Rousselot^{h,i}, Randa Bittar^{h,j,1}, Foudil Lamari^{h,1}, Vincent Navarro^{a,c,d,k,*}, On Behalf of the Study Group²

^a Sorbonne Université, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, INSERM U 1127, CNRS UMR 7225, Paris, France

^b AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, DMU Neurosciences 6, Department of Neurology, Neuro-ICU, Paris, France

^c AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, DMU Neurosciences 6, Epileptology Unit and Clinical Neurophysiology Department, Paris, France

^d Sorbonne Université, 75006 Paris, France

^e Sorbonne Université, INSERM, UMR_S1158 Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, 75005 Paris, France

^f AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Pneumologie, Médecine Intensive et Réanimation (Département R3S), Paris, France

^g AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, DMU Neurosciences 6, Department of Neuropathology, Paris, France

^h AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Department of Metabolic Biochemistry, Paris, France

ⁱ UTCBS, INSERM U 1267, UMR 8258 CNRS, Université de Paris, Paris, France

^j Sorbonne Université, UMR_S 1166 ICAN, F-75013 Paris, France

^k Center of Reference for Rare Epilepsies, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

24-hydroxycholesterol
Cholesterol
Status epilepticus
Excitotoxicity

ABSTRACT

The understanding of the excitotoxic processes associated with a severe status epilepticus (SE) is of major importance.

Changes of brain cholesterol homeostasis is an emerging candidate for excitotoxicity. We conducted an overall analysis of the cholesterol homeostasis both (i) in fluids and tissues from patients with SE: blood (n = 63, n = 87 controls), CSF (n = 32, n = 60 controls), and post-mortem brain tissues (n = 8, n = 8 controls) and (ii) in a mouse model of SE induced by an intrahippocampal injection of kainic acid.

24-hydroxycholesterol levels were decreased in kainic acid mouse hippocampus and in human plasma and post-mortem brain tissues of patients with SE when compared with controls. The decrease of 24-hydroxycholesterol levels was followed by increased cholesterol levels and by an increase of the cholesterol synthesis. Desmosterol levels were higher in human CSF and in mice and human hippocampus after SE. Lanosterol and dihydrolanosterol levels were higher in plasma from SE patients.

Our results suggest that a CYP46A1 inhibition could occur after SE and is followed by a brain cholesterol accumulation. The excess of cholesterol is known to be excitotoxic for neuronal cells and may participate to neurological sequelae observed after SE. This study highlights a new pathophysiological pathway involved in SE excitotoxicity.

1. Introduction

Status epilepticus (SE) is a life-threatening prolonged epileptic seizure (Trinka et al., 2015). In 25% of cases, SE is refractory (RSE) to antiepileptic drugs (AED) and requires anesthetics (Rossetti and

Lowenstein, 2011). The excessive and sustained activation of neurons can induce excitotoxic processes. As a result, patients may present brain atrophy on MRI, especially in hippocampal structures, with subsequent severe neurologic sequelae, such as cognitive disorders (memory impairment) and a further development of epilepsy (Rossetti et al., 2006).

* Corresponding author at: Sorbonne Université, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, INSERM U 1127, CNRS UMR 7225, Paris, France.

E-mail address: vincent.navarro@aphp.fr (V. Navarro).

¹ These authors contributed equally to the manuscript.

² Please see the collab authors listed under the study group section.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105346>

Received 14 January 2021; Received in revised form 5 March 2021; Accepted 22 March 2021

Available online 24 March 2021

0969-9961/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations	
24-OHc	24-hydroxycholesterol
25-OHc	25-hydroxycholesterol
ABC	ATP-binding cassette
AED	antiepileptic drug
ApoA1	apolipoprotein A1
ApoE	apolipoprotein E
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BBB	blood-brain barrier
CI	confidence intervals
CONT	controls
EC	esterified cholesterol
EPI	epileptic patients
f	female
FC	free cholesterol
FCONT	functional controls
HDL-c	HDL-cholesterol
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
ICU	intensive care unit
KA	kainic acid
LDL	Low-density lipoprotein
Lp-PLA2	lipoprotein-associated phospholipase A2
LXR	Liver X receptor
m	male
NORSE	new-onset refractory status epilepticus
NRSE	non-refractory status epilepticus
PBS	phosphate-buffered solution
PSRSE	prolonged super-refractory status epilepticus
RSE	refractory status epilepticus
SD	standard deviation
SE	status epilepticus
SEM	standard error of the mean
TC	total cholesterol
TG	triglycerides
UPLC-MS/MS	ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer

The understanding of the pathophysiological mechanisms underlying the excitotoxic processes is crucial to better manage the SE by identifying new neuroprotective therapeutics and prevent neurological sequelae that may impact the patient's life quality. We focused on an emerging pathway, the brain cholesterol homeostasis (de Freitas et al., 2010). Brain cholesterol plays a major role in brain development, synaptogenesis and neuronal activity by inhibition or potentiation of voltage-dependent and ligand-gated ion channels activity (Björkhem and Meaney, 2004; Dietschy and Turley, 2004; Korinek et al., 2015; Levitan et al., 2014). Brain cholesterol is synthesized *de novo*, mostly by astrocytes through the Bloch pathway and to a lesser extent in neurons through the Kandutsch-Russel pathway (Mitsche et al., 2015; Zhang and Liu, 2015). Then, cholesterol is transported by apolipoprotein E (ApoE) to neurons. Cholesterol can't freely cross the intact blood-brain barrier (BBB) (Dietschy and Turley, 2004). Cholesterol is metabolized into 24-hydroxycholesterol (24-OHc) by the neuron-specific cholesterol-24 hydroxylase enzyme, encoded by the *CYP46A1* gene (Björkhem et al., 1998; Ramirez et al., 2008). In contrast to cholesterol, 24-OHc can be exported across the BBB and regulates the synthesis and the transport of cholesterol by a negative feedback (Leoni and Caccia, 2013).

Disturbances in brain cholesterol homeostasis were reported in neurodegenerative disorders where excitotoxicity plays a major role (Boussicault et al., 2016; Djelti et al., 2015; Martins et al., 2009). Especially, brain cholesterol accumulation, secondary to *CYP46A1* downregulation, was found excitotoxic and responsible of neuronal death (Boussicault et al., 2016; Djelti et al., 2015; Martins et al., 2009). We also reported that blocking *CYP46A1* expression in mouse hippocampus resulted in cholesterol accumulation, secondary epileptic abnormalities and progressive neuronal loss (Chali et al., 2015). These cellular and electrographic changes were similar to those observed: (i) in patients who presented with a RSE after the control of the SE and (ii) in animal models of SE two weeks after the induction of SE by kainic acid (KA). It suggests that disturbances in brain cholesterol homeostasis may occur during SE and participate to the excitotoxic processes. Especially, we wondered if a *CYP46A1* inhibition may occur during SE, and be followed by a decrease of 24-OHc levels and accumulation of cholesterol.

Preliminary data on changes of sterol levels in rodents treated by KA are conflicting (Chali et al., 2019; Heverin et al., 2012; Kim et al., 2010; Ong et al., 2010). This may be explained by the large variabilities in methodological processes: different time point assessments and different anatomical sources. The relation between brain and peripheral compartments were rarely studied. To date, the brain cholesterol

homeostasis has never been explored in SE patients.

For the first time we aim to characterize the changes in sterol levels both in SE patients and in KA mouse model of SE. To study the kinetic changes, we evaluated sterol levels at different time points after SE onset. In addition, to assess the relationship between the brain and the peripheral compartments, we performed analysis in blood, CSF and brain tissues.

Firstly, we investigated if a *CYP46A1* inhibition occurs after SE and if it is followed by a decrease of 24-OHc levels.

Secondly, as 24-OHc regulates cholesterol synthesis, we studied the impact of decreased 24-OHc levels on brain and peripheral cholesterol synthesis.

Thirdly, we studied several ways of exchange between the brain and the peripheral compartments, such as blood-brain barrier permeability, and lipid transport.

2. Materials and methods

2.1. Human fluid study

2.1.1. Study design, settings and participants

We prospectively enrolled both men and women patients from intensive care unit (ICU) and neurology units of Pitié-Salpêtrière Hospital, from February 2013 to May 2019. The protocol was approved by our local (2012, CPP Paris-VI) and by the INSERM ethic committees (C16-16, 20152482). Patients or relatives were informed and no one has opposed. The study design and report are in accordance with the STROBE statement (Cuschieri, 2019).

We included patients aged of 16 years or over and admitted to ICU with an ongoing SE. SE was diagnosed according to the International League Against Epilepsy (Trinka and Kälviäinen, 2017). Patients with post-anoxic SE or with an associated neurodegenerative disease were excluded. SE patients were divided into three groups: non-refractory status epilepticus (NRSE), refractory status epilepticus (RSE) and prolonged super refractory status epilepticus (PSRSE) (Hirsch et al., 2018). RSE is defined as a failure of at least two appropriately selected and dosed parenteral medications including a benzodiazepine, with no specific seizure duration required (Hirsch et al., 2018). PSRSE is defined as a RSE that persists for at least 7 days, including ongoing need for anesthetics (Hirsch et al., 2018).

We included control patients (CONT), who were hospitalized in neurology units of Pitié-Salpêtrière Hospital, aged of 16 years or over. They were divided into two groups: (i) *functional* controls (FCONT) if

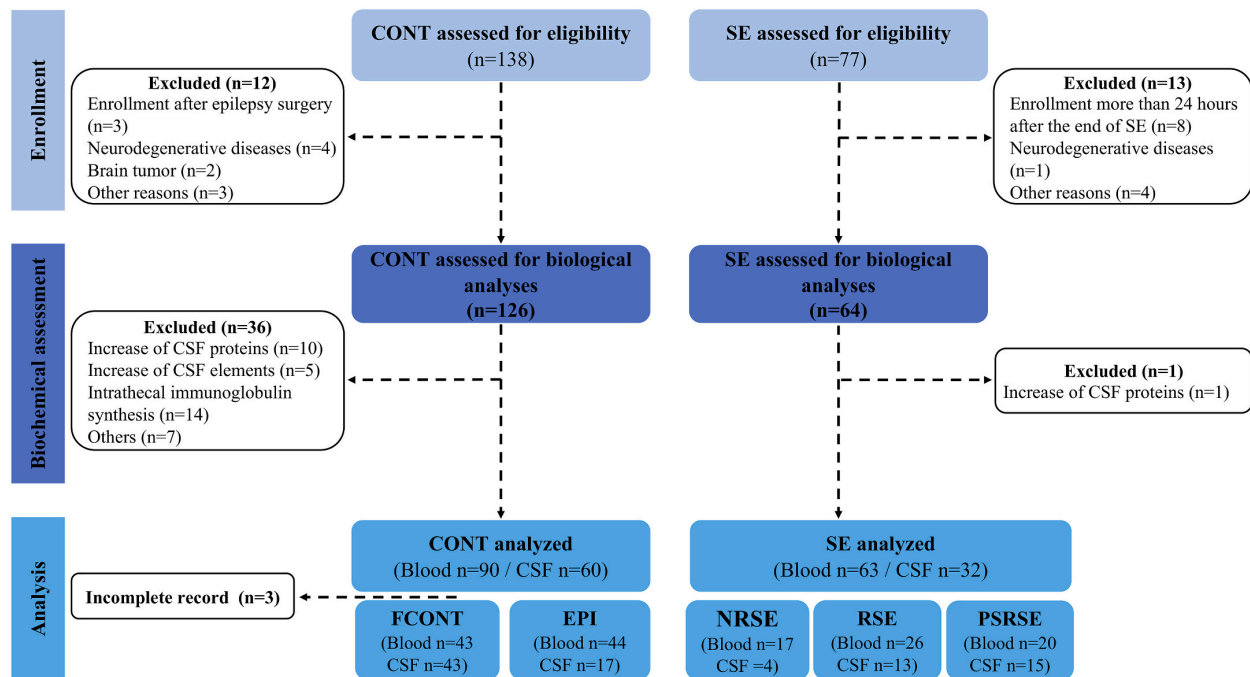


Fig. 1. Flow chart of the study population.

they had functional neurological disorder, based on normality of clinical examination and lumbar puncture, and (ii) *epileptic* controls (EPI) including patients with epilepsy but no SE. Patients with a neurodegenerative disease were also excluded.

2.1.2. Variables

The primary objective was to characterize the cholesterol homeostasis disturbances related to SE with regards to blood, CSF and brain tissues. Venous blood and CSF samples were drawn to measure lipid parameters, hydroxycholesterols, FC and cholesterol synthesis precursors levels with protocols described below. Analyses were performed on blood from 63 SE patients and 87 CONT. Lumbar punctures were only done for diagnostic purpose and concerned 32 SE patients and 60 CONT (Fig. 1).

2.1.3. Study size

This is the first human study conducted to evaluate brain cholesterol homeostasis disturbances induced by SE. Nevertheless, on the basis of animal literature, we estimated that SE patients were four times more likely to present disturbances in lipid homeostasis (OR = 4) and those disturbances could be observed in 10% of control patients. Therefore, a total sample size of 136 participants was required for the study (alpha = 5%, beta = 20%). An interim analysis showed a higher rate of the endpoint than expected (OR = 4.5), which reduced the required sample size to 112 participants.

2.2. Human tissues extract

Post-mortem human frozen samples and paraffin tissues of hippocampus, lateral temporal cortex and frontal cortex were obtained from eight controls with no history of acute neurological or psychiatric disorders (delay post death = 33 h), and eight patients with SE diagnosed clinically or based on EEG (delay post death = 48 h). The Table 1 gives patient's gender and age, delay of examination post death, cause of death and which frozen and/or paraffin tissues were available for each patient.

2.3. Mouse model of epilepsy

All experimental studies were performed in accordance with the European Committee Council Directive (2010/63/UE) and approved by the local ethics committee (A75-13-19; 8302-2017). Experiments were performed on C57BL/6 J male mice, aged of 2 months of age and weighing 20-25 g (n = 99).

2.3.1. Kainate injection and intracranial surgery

Mice were anesthetized with 2-4% isoflurane performed with analgesia (Buprecare) and placed in a stereotaxic frame. Kainic acid (KA, 50 nL; 20 mM in PBS) or phosphate-buffered-solution (PBS, 50 nL) for control mice, were injected into the right hippocampus (anterior-posterior, -1.8 mm; medio-lateral, -1.8 mm; dorso-ventral, -1.8 mm, with respect to the bregma). This site corresponds to distal dendritic regions of CA1 pyramidal cells (Le Duigou et al., 2008). After injection, 7 mice (2 PBS, 5 KA) were directly implanted with two bipolar stainless-steel electrodes inserted respectively into the right and left hippocampus. A reference electrode was placed on the cerebellum of each mouse. All coordinates were derived and adjusted from Paxinos and Watson mice brain atlas (Paxinos et al., 1985).

2.3.2. Video-EEG recordings

Implanted mice were freely moving and connected to an ADC amplifier, part of a video-EEG acquisition system (Deltamed, Natus). EEG signals were acquired at 4096 Hz and band pass filtered (0.5-70 Hz). Continuous video-EEG recordings were performed during 72 h after surgery, then at 6-7 days and at 14-15 days after surgery. Signal analyses were achieved using Deltamed software.

2.3.3. Mice brain tissues preparation

Animals were euthanized, at 1, 3, 7 or 15 days after KA-injection or PBS-injection, by an intraperitoneal injection of pentobarbital. For biochemical analyses, ipsi- and contralateral hippocampus (n = 26 KA-injected mice and n = 26 PBS-injected mice; 6 mice per group at 3 and 7 days and 7 mice per group at 1 and 15 days) were dissected. For

Table 1
Clinical data from post-mortem patients.

Patient: gender, age,	Group	Delay of brain examination post death, hours	Frozen tissues	Paraffin tissues	SE etiology	Cause of death	Prior history of epilepsy (Yes/No)	SE duration, days
1. m, 60	Control	18	Frontal Ctx Temporal Ctx	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	–	Hemorrhagic shock	No	–
2. f, 66	Control	54	Frontal Ctx Temporal Ctx	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	–	Multiorgan failure	No	–
3. f, 66	Control	36	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	–	Pulmonary emboli	No	–
4. m, 66	Control	26	Frontal Ctx Temporal Ctx	–	–	Septic shock	No	–
5. m, 55	Control	48	Frontal Ctx Temporal Ctx	–	–	ARDS	No	–
6. f, 29	Control	32	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	–	–	Septic Shock	No	–
7. m, 85	Control	Not precised	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	–	–	Exacerbation of diabetes	No	–
8. f, 46	Control	17	Frontal Ctx Temporal Ctx	–	–	Multiorgan failure	Yes	–
1. m, 31	SE	22	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	NORSE	Withdrawal of life sustaining therapy	No	106
2. f, 27	SE	22	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	Frontal Ctx Hippocampus	NORSE	Multiorgan failure	No	9
3. m, 70	SE	74	–	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	NORSE	Not available	No	55
4. f, 56	SE	46	–	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	AED withdrawal	Multiorgan failure	Yes	44
5. f, 39	SE	67	–	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	NORSE	NORSE / Septic Shock	No	34
6. f, 41	SE	70	–	Frontal Ctx Temporal Ctx Hippocampus	NORSE	Not available	No	14
7. m, 29	SE	Not precised	–	Ammon's horn	Alcohol induced	Septic Shock	Yes	13
8. f, 70	SE	36	–	Frontal Ctx Hippocampus	Unknown	Pulmonary emboli	Yes	17

Abbreviations: AED = antiepileptic drug; ARDS = Acute Respiratory Distress Syndrome; f = female; m = male; NORSE = New-Onset Refractory Status Epilepticus; SE = status epilepticus.

immunohistochemistry studies, mice (n = 20 KA-injected mice and n = 20 PBS-injected mice; 5 mice per group, per time) were perfused intracardially with 4% paraformaldehyde.

2.4. Histology and immunohistochemistry

Mouse and human post-mortem brain slices were washed in PBS, and exposed to citrate buffer and Triton. Primary antibodies were applied overnight at 4 °C (NeuN, 1:500, MAB377 Merck-Millipore; CYP46A1, 1:500, ab82814 abcam). Secondary antibodies were applied for 1-h at room temperature (Alexa fluor-555-donkey-anti-mouse, 1:500 for NeuN; Alexa fluor-488-donkey-anti-rabbit, 1:500 for CYP46A1). Images were acquired with Zen software (Zeiss) and fluorescence intensities were quantified using ImageJ software (NIH).

2.5. Biochemical analyses for hydroxycholesterols and cholesterol precursors

Human and mouse tissues were put in an HEPES buffer and homogenized. Homogenates were centrifuged and supernatants were collected. Sterol concentrations were normalized by total protein concentration, evaluated by the bicinchoninic acid assay (Sigma-Aldrich).

An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS) with isotopic dilution method was used to measure hydroxycholesterols (24-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol) in plasma, CSF and homogenate brain tissues (Marelli et al., 2018). A similar protocol was applied for sterols (cholesterol, lanosterol, dihydrolanosterol and desmosterol) measurements, with an incubation at room temperature during 45-min.

We measured sitosterol levels, by UPLC-MS/MS, to assess BBB permeability. Sitosterol is a plant sterol only provided via food uptake which was proposed to reflect BBB integrity (Heverin et al., 2004; Saeed et al., 2015).

2.6. Lipid parameters

Venous blood samples were collected and centrifuged to obtain serum. Total cholesterol (TC), triglycerides (TG), HDL-cholesterol (HDL-c) were analyzed by enzymatic methods and apolipoprotein A1 (ApoA1) and apolipoprotein B100 (ApoB) by immunoturbidimetric method on Cobas analyzer (Roche). Free cholesterol (FC) was analyzed by colorimetric method on Konelab 30i analyzer (Thermo Fisher Scientific). Esterified cholesterol (EC) was calculated by difference (EC = TC-FC). Apolipoprotein E (ApoE) was measured by immunonephelometric

Table 2
Biological and demographic characteristics of the study cohort.

	SE	NRSE	RSE	PSRSE	CONT patients	FCONT	EPI
Blood, N (%)	63	17 (27%)	26 (41%)	20 (32%)	87	43 (49%)	44 (51%)
Age, years [CI 95%]	50.3 [45.6–54.9]	59.1 [51.6–66.7]	50.2 [42.7–57.7]	42.8 [34.0–51.6]	46.3 [42.2–50.3]	53.7 [47.5–60.0]	39.0 [34.7–43.2]
Sex (m/f %)	63	71	73	45	41	47	36
ASAT/ALAT, AU [CI 95%]	1.59 [1.24–1.94]	2.40 [1.23–3.56]	1.49 [0.99–1.98]	1.14 [0.96–1.32]	1.26 [1.11–1.41]	1.17 [0.99–1.34]	1.40 [1.13–1.67]
Creatinine, $\mu\text{mol/L}$ [CI 95%]	72.3 [56.6–87.9]	101.4 [46.9–155.7]	65.2 [56.0–74.3]	55.6 [42.8–68.4]	71.2 [66.9–75.5]	71.5 [66.0–77.0]	70.8 [63.4–78.1]
24-OHc, $\mu\text{g/L}$ [CI 95%]	37.2 [32.5–41.9]	28.4 [23.6–33.2]	40.6 [32.7–48.5]	40.2 [30.3–50.2]	44.2 [41.1–47.3]	42.4 [37.9–46.9]	46.0 [41.7–50.3]
25-OHc, $\mu\text{g/L}$ [CI 95%]	23.8 [16.1–31.5]	14.6 [11.0–18.2]	24.9 [17.3–32.5]	30.2 [7.58–52.9]	18.8 [15.5–22.2]	17.7 [12.5–22.8]	20.1 [15.6–24.5]
TC, g/L [CI 95%]	1.59 [1.48–1.71]	1.42 [1.19–1.65]	1.76 [1.58–1.94]	1.53 [1.34–1.72]	1.94 [1.85–2.03]	1.88 [1.74–2.02]	2.00 [1.88–2.12]
FC, g/L [CI 95%]	0.60 [0.54–0.66]	0.50 [0.38–0.63]	0.56 [0.51–0.62]	0.72 [0.57–0.86]	0.57 [0.54–0.59]	0.55 [0.52–0.58]	0.59 [0.55–0.62]
EC, g/L [CI 95%]	1.01 [0.91–1.11]	0.92 [0.75–1.08]	1.22 [1.08–1.36]	0.82 [0.62–1.02]	1.37 [1.30–1.44]	1.29 [1.19–1.38]	1.45 [1.35–1.55]
EC/TC, AU [CI 95%]	0.62 [0.58–0.65]	0.64 [0.60–0.69]	0.68 [0.65–0.70]	0.52 [0.42–0.61]	0.70 [0.70–0.71]	0.70 [0.69–0.71]	0.71 [0.70–0.72]
HDL-c, g/L [CI 95%]	0.37 [0.32–0.42]	0.45 [0.33–0.58]	0.42 [0.35–0.49]	0.23 [0.16–0.29]	0.54 [0.51–0.58]	0.53 [0.48–0.58]	0.56 [0.50–0.61]
TG, g/L [CI 95%]	1.78 [1.39–2.17]	1.25 [0.84–1.65]	1.45 [0.97–1.92]	2.67 [1.72–3.62]	1.26 [1.09–1.44]	1.31 [1.10–1.52]	1.21 [0.93–1.50]
ApoA1, g/L [CI 95%]	1.05 [0.96–1.15]	1.16 [0.92–1.41]	1.16 [1.05–1.26]	0.81 [0.66–0.96]	1.42 [1.36–1.48]	1.39 [1.30–1.47]	1.46 [1.37–1.54]
ApoB, g/L [CI 95%]	0.92 [0.83–1.00]	0.66 [0.53–0.79]	1.00 [0.86–1.13]	1.03 [0.89–1.17]	0.94 [0.89–1.00]	0.90 [0.83–0.97]	0.99 [0.90–1.07]
Lanosterol, $\mu\text{g/L}$ [CI 95%]	42.5 [30.3–54.7]	24.7 [17.7–31.7]	38.5 [25.0–52.1]	61.7 [29.5–94.0]	30.0 [19.9–39.6]	27.7 [14.9–40.5]	31.5 [15.7–47.3]
Dihydrolanosterol, $\mu\text{g/L}$ [CI 95%]	19.0 [13.1–25.0]	12.0 [–1.15–25.1]	13.7 [7.72–19.7]	29.5 [17.1–41.8]	9.99 [8.19–11.8]	9.49 [6.81–12.2]	10.4 [7.90–13.0]
Desmosterol, $\mu\text{g/L}$ [CI 95%]	362.6 [301.8–423.4]	373.4 [132.5–614.3]	358.5 [294.4–422.5]	363.2 [218.2–508.1]	425.9 [358.3–493.4]	461.4 [350.8–572.0]	387.1 [309.2–465.0]
Sitosterol, $\mu\text{g/L}$ [CI 95%]	2309.4 [1154.6–3464.2]	896.2 [–37.4–1829.9]	1018.7 [564.2–1473.1]	5580.8 [2018.7–9142.8]	540.2 [448.9–631.5]	524.0 [379.0–669.0]	558.1 [444.7–617.6]
ApoE, mg/dL [CI 95%]	5.67 [5.00–6.34]	5.00 [3.44–6.55]	4.92 [4.46–5.37]	7.31 [5.82–8.80]	4.37 [4.06–4.68]	4.22 [3.73–4.70]	4.51 [4.11–4.91]
CSF, N (%)	32	4 (12%)	13 (41%)	15 (47%)	60	43 (72%)	17 (28%)
Age, years [CI 95%]	52.5 [45.8–59.2]	57.0 [40.9–73.1]	58.2 [47.5–68.8]	46.4 [35.4–57.4]	51.0 [45.9–56.0]	53.7 [47.5–60.0]	43.9 [35.5–52.4]
Sex (M/F %)	56	100	69	33	45	47	41
24-OHc, $\mu\text{g/L}$ [CI 95%]	1.74 [1.55–1.94]	1.60 [1.04–2.17]	1.72 [1.38–2.05]	1.80 [1.47–2.13]	1.60 [1.49–1.70]	1.61 [1.46–1.75]	1.57 [1.45–1.69]
Cholesterol, mg/L [CI 95%]	2.36 [1.71–3.01]	3.83 [–0.82–8.48]	1.94 [1.35–2.53]	2.44 [1.22–3.66]	1.65 [1.22–2.07]	1.42 [1.01–1.84]	2.19 [1.06–3.32]
Desmosterol, $\mu\text{g/L}$ [CI 95%]	2.38 [2.05–2.70]	2.27 [2.19–2.34]	2.41 [1.95–2.87]	2.37 [1.77–2.97]	1.82 [1.66–1.98]	1.79 [1.60–1.98]	1.89 [1.56–2.21]
Lanosterol, $\mu\text{g/L}$ [CI 95%]	4.19 [0.29–8.09]	<<	1.2	4.69 [0.09–9.30]	2.51 [1.64–3.38]	2.69 [1.59–3.80]	2.06 [0.32–3.79]
Dihydrolanosterol, $\mu\text{g/L}$ [CI 95%]	0.36 [0.09–0.62]	<<	0.31 [0–0.63]	0.39 [–0.18–0.96]	0.36 [0.30–0.43]	0.35 [0.26–0.43]	0.41 [0.28–0.53]
Sitosterol, $\mu\text{g/L}$ [CI 95%]	3.53 [1.00–6.06]	3.30 [–8.14–14.7]	1.21 [0.48–1.95]	5.20 [0.28–10.12]	0.74 [0.52–0.97]	0.69 [0.47–0.90]	0.89 [0.20–1.58]
Sitosterol diffusion CSF/ (blood + CSF), AU [CI 95%]	0.0073 [–0.0016–0.016]	0.0063 [–0.062–0.074]	0.0042 [0–0.0086]	0.011 [–0.013–0.034]	0.0040 [0–0.0073]	0.0044 [0–0.0092]	0.0028 [0–0.0062]
ApoE, mg/dL [CI 95%]	0.34 [0.29–0.40]	0.35 [0.04–0.65]	0.32 [0.24–0.39]	0.36 [0.26–0.46]	0.38 [0.34–0.42]	0.40 [0.35–0.45]	0.33 [0.28–0.39]

Data are represented as percentages or mean [CI 95%].

method on BNII analyzer (Siemens).

2.7. ApoE phenotyping

ApoE isoforms were identified with the Hydrigel 18 ApoE Isofocusing (Sebia). A ready-to-use agarose gel containing ampholytes was used to perform a semi-automatic electrophoresis, followed by a specific immunofixation, on Hydrasys2 scan instrument (Bittar et al., 2020). Isoforms bands were compared to specific controls.

2.8. Western-blot analyses

Human post-mortem frozen tissues were homogenized in a Tris buffer, completed with a protease inhibitor and a benzonase nuclease and incubated at 37 °C for 30-min. Sodium dodecyl sulfate was added to 2%. Protein extracts were centrifuged and supernatants protein concentration was evaluated using the bicinchoninic acid assay. Proteins were separated on NuPAGE™ Bis-Tris Gel (Thermo Fisher Scientific) and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes (PRO-TAN™, Whatman GmbH). Primary antibody against CYP46A1 (1:1000) was applied over 3-h and secondary antibody (1:5000) over 1-h at room

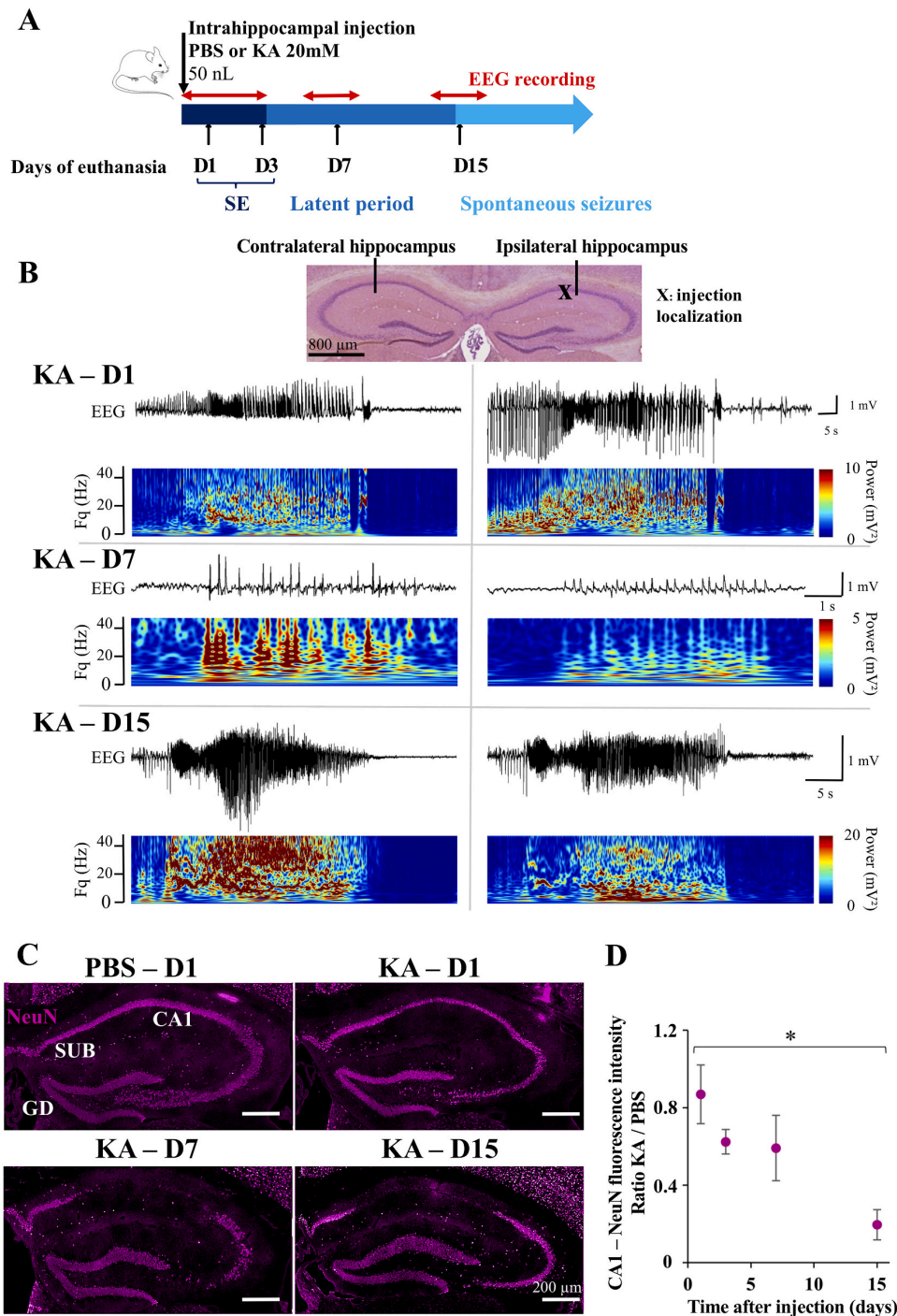
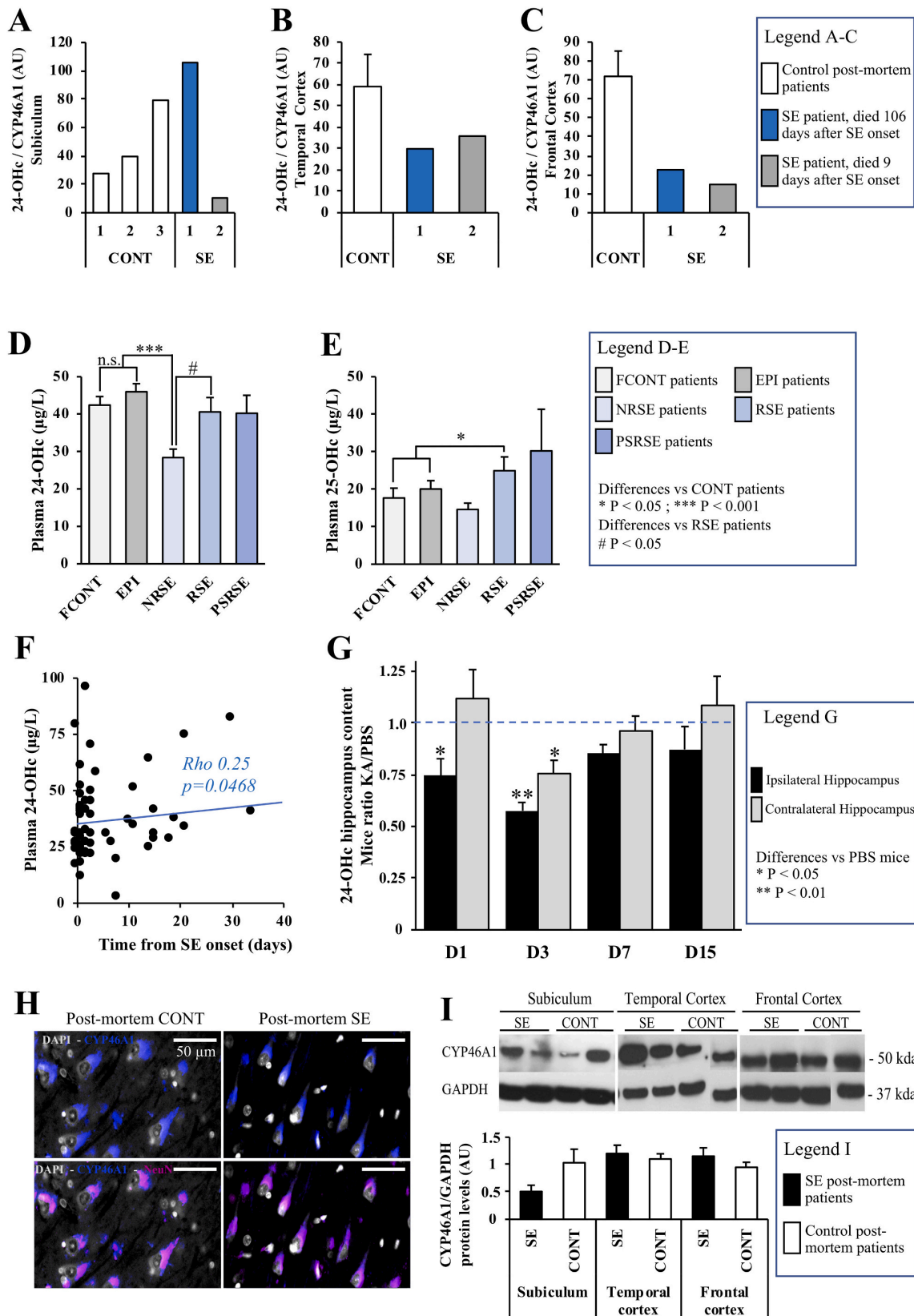


Fig. 2. Time course of epileptic activities and neuronal death after kainate injection. (A) KA injection is followed by three periods: SE for 3 days, a latent period, and emergence of spontaneous seizures at 15 days. Mice were euthanized 1, 3, 7 or 15 days after injection. (B) Extract of an EEG of ipsilateral (right) and contralateral (left) hippocampus, from a KA mouse, at 1 day after the injection showing continuous polyspikes starting in the ipsilateral and spreading in the contralateral hippocampus (top), at 7 days showing interictal epileptiform discharges (middle) and at 15 days showing a spontaneous seizure followed by prolonged postictal depression with flattening of the EEG (down). Time frequency analysis of each EEG pattern is presented below the EEG extract. (C) NeuN (magenta) neuronal staining of the hippocampus shows a progressive reduction of neuronal density in CA1 region of KA injected mice at 7 days (D7) and 15 days (D15) in comparison with PBS injected mice and KA injected mice at 1 day (D1). Scale bar = 200 μ m. (D) Kinetics of disappearance of NeuN+ cells in CA1 region from the 1st day to the 15th day after intrahippocampal injection. Data are represented with the ratio of KA to PBS mice (mean \pm SEM density; 5 animals; statistical analyses: Mann-Whitney test). The * indicates significant decrease ($P = 0.027$) of the fluorescence intensity between D1 and D15.



(caption on next page)

Fig. 3. Status epilepticus induces a decrease of 24-OHc levels both in humans and mice

(A-C) 24-OHc levels were measured respectively in the homogenates of subiculum from CONT (n = 3) and SE patients (n = 2) post-mortem tissues (A), lateral temporal cortex from CONT (n = 8) and SE patients (n = 2) post-mortem tissues (B) and frontal cortex from CONT (n = 8) and SE patients (n = 2) post-mortem tissues (C). Data were normalized by the concentration of the CYP46A1 in the extracts. (D) 24-OHc levels in the plasma of CONT and SE patients. Values of the different subgroups (FCONT, EPI, NRSE patients, RSE patients and PSRSE patients) are presented. We performed pairwise comparisons after a one-way ANOVA test. (E) 25-OHc levels in the plasma of CONT and SE patients. Values of the different subgroups (FCONT, EPI, NRSE patients, RSE patients and PSRSE patients) are presented. We performed pairwise comparisons after a one-way ANOVA test. (F) 24-OHc plasma levels were correlated with the time between SE onset and blood sampling (days). The degree of correlation was evaluated with the Spearman test ($\rho = 0.25$; $P = 0.047$). (G) 24-OHc levels were measured in both ipsilateral hippocampus (black bars) and contralateral hippocampus (grey bars) from mice at the four time points after KA injection (n = 6–7 per time, per group). Data were normalized to those of PBS mice at each time. (H) Human paraffin post-mortem slices were stained with the monoclonal antibody against the CYP46A1 (blue). Strong expression was detected in the subiculum region, in which CYP46A1 staining was polarized and visible in the cell bodies and dendrites of pyramidal neurons, from both CONT and SE post-mortem tissues (top). Co-labelling of CYP46A1 and NeuN (magenta) immunostaining in hippocampus subiculum region shows a strong co-localization (down). No variation of intensity was found between CONT (n = 3) and SE post-mortem patients (n = 7). Scale bar = 50 μm . (I) Examples of frozen post-mortem subiculum, lateral temporal cortex and frontal cortex from CONT and SE patients which were processed for western blotting with antibodies directed against CYP46A1 and GAPDH (top). Quantification of CYP46A1 levels normalized to GAPDH from CONT (n = 3 and 8 respectively for subiculum and cortex) and SE patients (n = 2) extracts (down).

All data are represented as mean \pm SEM; statistical analyses: Student *t*-test and Mann-Whitney test when appropriate. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ for NRSE patients or RSE patients versus CONT or KA-mice versus PBS-mice. # $P < 0.05$ when compared with RSE patients.

temperature. Signals were detected using ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). Signal intensities were analyzed, on a blinded fashion, with MultiGauge 3.0 software. CYP46A1 concentrations were found by densitometry analysis.

2.9. Statistical analysis

Analyses were performed with R Software (R.3.5.0).

We first performed one-way ANOVA tests to evaluate subgroups impact. Then, pairwise comparisons were performed using Student, Mann-Whitney, or χ^2 tests when appropriate. The sequential rejective Benjamini-Hochberg test procedure was used to correct for multiple comparisons. Shapiro-Wilk test was performed to assess normality of data distribution. Correlations were evaluated calculating respective Spearman's rho values and their level of significance. Results were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Study participants

The number of patients for each subgroup and each biological compartment are summarized in Fig.1. Main demographic and biological characteristics are summarized in Table 2. NRSE patients were included more quickly after SE onset than those with RSE ($P = 0.028$).

3.2. Time course of epileptic activities and neuronal death in mice after KA injection

3.2.1. Electrophysiological features

Following KA injection, EEG recordings showed SE, defined by intermittent seizures without recovery of normal background between successive seizures, which began after 30-min and lasted for 3 days (Fig. 2A–B). At 6–7 days post-injection, we observed an interictal activity including spike-and-wave discharges in both hippocampi. After 2 weeks, we observed spontaneous clonic seizures followed by prolonged postictal depression with EEG flattening (Fig. 2A–B).

3.2.2. Histological analyses

A severe progressive neuronal loss was seen in CA1 region (Fig. 2C), starting at the 3rd day and almost total at the 15th day (Fig. 2D).

3.3. SE induces a decrease of 24-OHc levels both in humans and mice

3.3.1. 24-OHc levels in human post-mortem brain tissues

24-OHc levels were measured in subiculum, lateral temporal cortex and frontal cortex from frozen extracts of post-mortem patients (SE

patients n = 2, CONT n = 3), and normalized by CYP46A1 concentration. In subiculum, we found a higher 24-OHc/CYP46A1 ratio for one patient when compared with CONT (Fig. 3A). This patient died after 106 days of a New Onset Refractory Status Epilepticus (NORSE, new onset refractory status epilepticus without a clear acute or active structural, toxic or metabolic cause in a patient without active epilepsy or other preexisting relevant neurological disorder (Hirsch et al., 2018)) and presented with hippocampal atrophy at brain examination. In contrast, there was a decrease of the ratio for the second patient who died only 9 days after SE onset and also suffering from a NORSE (Fig. 3A). In temporal cortex and frontal cortex, we found decreased ratio for both patients (Fig. 3B–C).

3.3.2. 24-OHc levels in human plasma and CSF

We measured 24-OHc levels in CSF and plasma of CONT and SE patients (Table 2). No significant change in CSF 24-OHc levels were found in SE patients, as compared to CONT. However, plasma 24-OHc levels were significantly lower in SE patients when compared with CONT ($P = 0.00064$), FCONT ($P = 0.018$) and EPI ($P = 0.00087$). No difference was found between FCONT and EPI ($P = 0.25$), suggesting that reduced 24-OHc levels are not related to sporadic seizures (Fig. 3D). Among SE patients, only NRSE patients had significantly reduced 24-OHc levels when compared with CONT ($P < 0.001$). NRSE patients showed also lower 24-OHc levels than RSE patients ($P = 0.043$) (Fig. 3D). In contrast to 24-OHc, we found increased 25-hydroxycholesterol (25-OHc) plasma levels for SE patients when compared with FCONT ($P = 0.043$). RSE patients showed also higher 25-OHc levels than CONT patients ($P = 0.035$) (Fig. 3E). We studied the relationship between plasma 24-OHc levels and the time between SE onset and blood sampling: patients who were enrolled quickly after SE onset had significantly lower 24-OHc levels, than those enrolled later ($\rho = 0.25$; $P = 0.047$) (Fig. 3F).

3.3.3. 24-OHc levels in the hippocampus of KA-induced SE mice

We then measured 24-OHc levels both in ipsilateral and contralateral hippocampi from KA mice. Levels were normalized by the total protein concentration, and expressed as the ratio of 24-OHc levels for KA mice and for PBS mice (Fig. 3G). We observed a significant decrease of the ratio the first day after injection in the ipsilateral hippocampus ($P = 0.047$). At the third day, ratios were decreased in ipsilateral ($P = 0.0015$) and contralateral hippocampi ($P = 0.047$). There was no difference between KA and PBS mice during the latent period (D7) and at the time of spontaneous seizures (D15). Decreased 24-OHc levels in KA mice preceded the decrease in NeuN+ cells (Fig. 2D), indicating that the reduced 24-OHc production by the CYP46A1 is not merely related to the neuronal death.

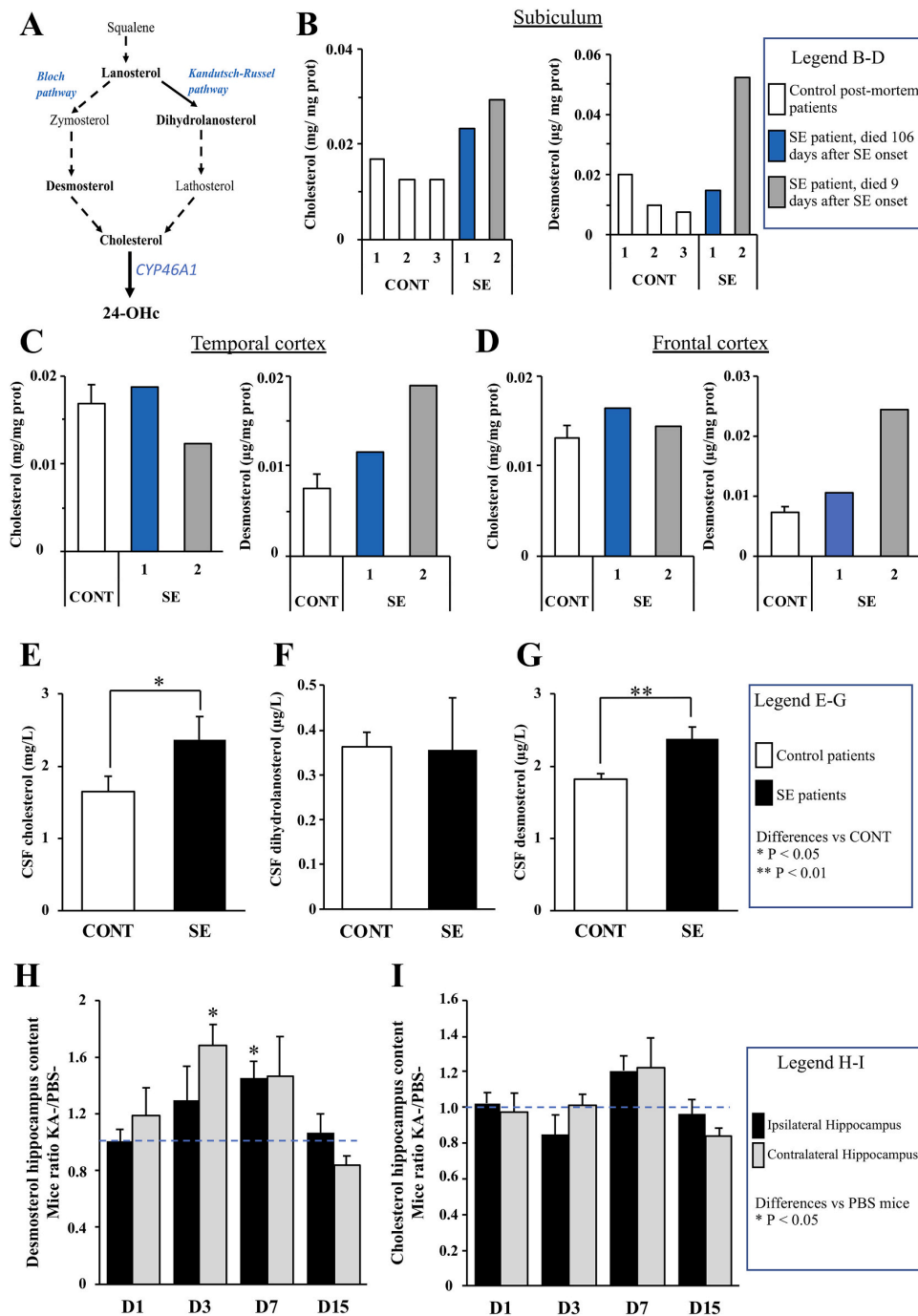
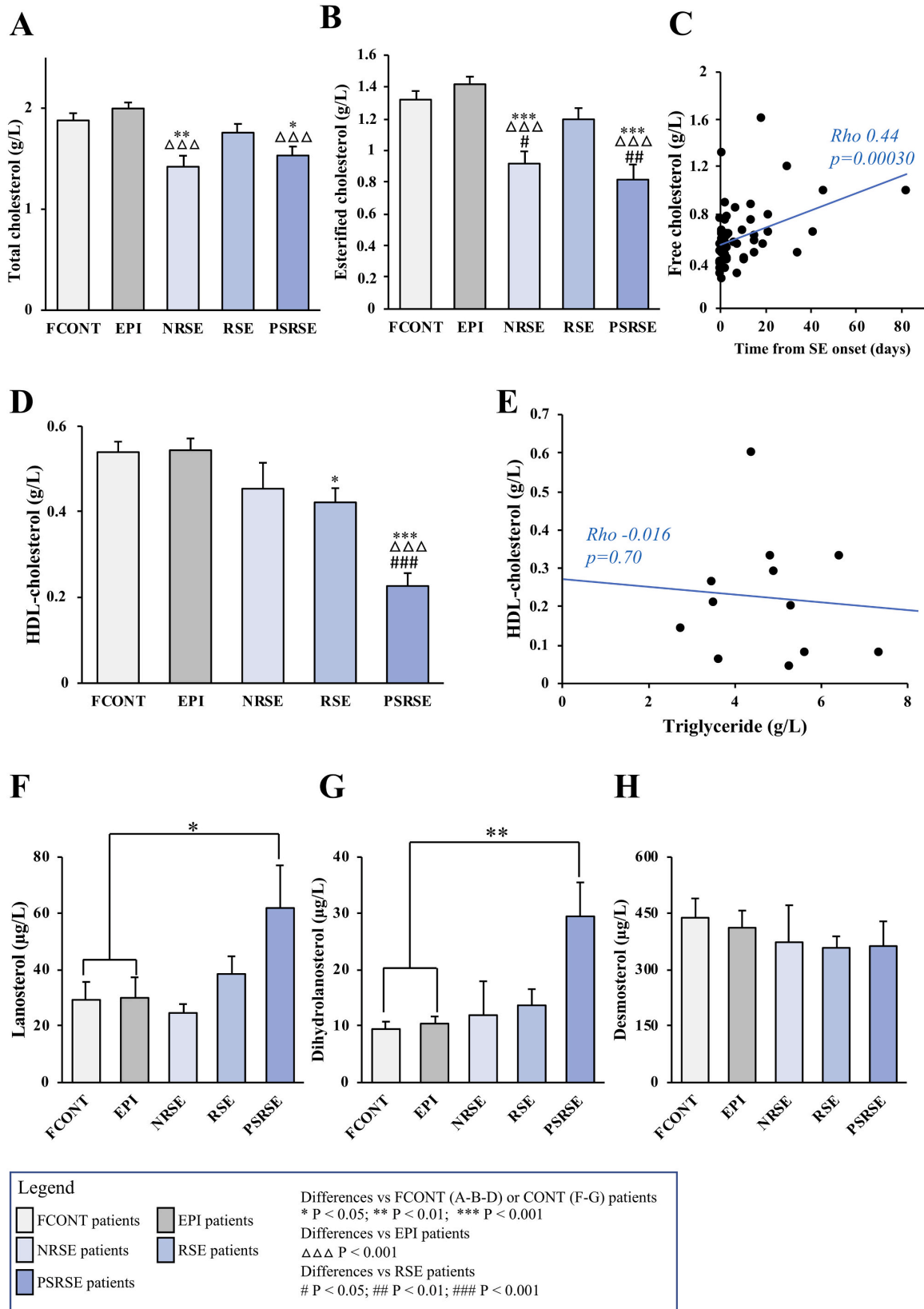


Fig. 4. Status epilepticus induces an abnormal increase in brain cholesterol synthesis.

(A) Schematic representation of the two enzymatic pathways for the conversion of squalene to cholesterol: Bloch and Kandutsch-Russel pathways, respectively shown on the left and on the right side. Sterols in bold were measured by UPLC-MS/MS. (B, C and D) Cholesterol and desmosterol levels were measured respectively in subiculum homogenates from CONT ($n = 3$) and SE patients ($n = 2$) post-mortem tissues (B), in homogenates of lateral temporal cortex from CONT ($n = 8$) and SE patients ($n = 2$) post-mortem tissues (C) and in homogenates of frontal cortex from CONT ($n = 8$) and SE patients ($n = 2$) post-mortem tissues (D). Data were normalized by the total protein concentration in the extracts. (E-G) Sterols were measured in the CSF of CONT patients and SE patients. (H) Desmosterol levels were measured in both ipsilateral hippocampus (black bars) and contralateral hippocampus (grey bars) from KA injected mice at the four time points ($n = 6-7$ per time, per group). Data were normalized to those of PBS mice at each corresponding time points. (I) Cholesterol levels were measured in both ipsilateral hippocampus (black bars) and contralateral hippocampus (grey bars) from mice at the four time points after KA injection ($n = 6-7$ per time, per group). Data were normalized to those of PBS mice at each corresponding time points.

All data are represented as mean \pm SEM; statistical analyses: Mann-Whitney test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ for SE patients versus CONT or KA-mice versus PBS-mice.



(caption on next page)

Fig. 5. Status epilepticus induces modifications in peripheral cholesterol homeostasis.

Total cholesterol (A) and esterified cholesterol (B) were measured in the serum of FCONT, EPI, NRSE patients, RSE patients and PSRSE patients. (C) Free cholesterol levels were correlated with the time between SE onset and blood sampling (days). The degree of correlation was evaluated with the Spearman test ($\rho = 0.44$; $P = 0.00030$). (D–E) HDL-cholesterol levels were measured by enzymatic method (D) and levels were correlated with the triglyceride's concentration, in patients showing a hypertriglyceridemia ($TG > 2.5$ g/L). No correlation was observed using the Spearman test ($\rho = -0.116$; $P = 0.70$) (E). (F–H) Lanosterol, dihydrolanosterol and desmosterol levels were measured in the plasma of FCONT, EPI, NRSE patients, RSE patients and PSRSE patients. Data are represented as mean \pm SEM; statistical analyses: Student t-test and Mann-Whitney test when appropriate. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ when compared with FCONT or CONT. $\triangle P < 0.05$; $\triangle\triangle P < 0.01$; $\triangle\triangle\triangle P < 0.001$ when compared with EPI. # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$ when compared with RSE patients.

3.3.4. CYP46A1 expression levels in human post-mortem brain tissues

As we found decreased 24-OHc levels, we studied the expression of the CYP46A1. In CONT post-mortem tissues ($n = 3$), we found CYP46A1 expression in all cell bodies of subiculum pyramidal cells (Fig. 3H). In post-mortem tissues from SE patients ($n = 7$), we did not identify changes in the intensity or the localization of CYP46A1 fluorescence (Fig. 3H).

Then, we analyzed CYP46A1 protein expression levels in humans' frozen post-mortem subiculum (CONT $n = 3$, SE patients $n = 2$), lateral temporal cortex (CONT $n = 8$, SE patients $n = 2$) and frontal cortex (CONT $n = 8$, SE patients $n = 2$). Immunoblots of CYP46A1 showed no significant modifications in CYP46A1 levels in subiculum, lateral temporal cortex and frontal cortex of SE patients when compared with CONT (Fig. 3I).

3.4. SE induces an abnormal increase in brain cholesterol synthesis

As our previous results suggest a functional blockage of the CYP46A1, we then studied the substrate of this enzyme: the cholesterol and its precursors. Cholesterol synthesis from acetyl-CoA requires a lengthy biosynthesis and two parallel pathways: the Bloch pathway—which involves desmosterol synthesis—and the Kandutsch-Russel pathway—which involves dihydrolanosterol synthesis (Fig. 4A).

3.4.1. Sterol levels in human post-mortem brain tissues

We first measured sterol levels in the homogenates of subiculum, lateral temporal cortex and frontal cortex extracts. We found increased cholesterol and desmosterol levels in the subiculum of SE patients when compared with CONT (Fig. 4B). Levels were higher for the patient who had a lower 24-OHc/CYP46A1 ratio (Fig. 3A). In the temporal cortex, we found no modification in cholesterol levels for SE patients when compared with CONT (Fig. 4C). Nevertheless, as observed in the subiculum, we found increased desmosterol levels in SE patients (Fig. 4C). Similar results were obtained in the frontal cortex (Fig. 4D). No modification was found for lanosterol and dihydrolanosterol levels (data not shown).

3.4.2. Sterol levels in human CSF

Sterol levels were then measured in CSF from CONT and SE patients (Fig. 4E–G). CSF cholesterol levels were increased in SE patients when compared with CONT ($P = 0.036$) (Fig. 4E). To identify the synthesis pathway, we measured desmosterol and dihydrolanosterol levels. No modification of dihydrolanosterol levels was found (Fig. 4F), while a significant increase of desmosterol levels was observed for SE patients when compared with CONT ($P = 0.0027$) (Fig. 4G).

3.4.3. Sterol levels in mice KA model hippocampus

Next, sterol levels were measured in ipsilateral and contralateral hippocampi from KA and PBS mice (Fig. 4H–I). We observed a progressive increase in KA/PBS desmosterol ratios with a peak at 3 days (1.68, $P = 0.015$) for the contralateral hippocampus and at 7 days (1.45, $P = 0.025$) for the ipsilateral. We also observed a progressive increase in KA/PBS cholesterol ratio with a peak at 7 days ($P = 0.15$) (Fig. 4I). No modification was found for lanosterol and dihydrolanosterol levels (data not shown).

Altogether these data indicate that SE induces an abnormal increase

of brain cholesterol synthesis through the Bloch pathway.

3.5. SE induces disturbances in peripheral cholesterol homeostasis

3.5.1. Total cholesterol, free cholesterol and esterified cholesterol

SE patients had significantly lower total cholesterol (TC) levels when compared with CONT patients ($P < 0.001$). No difference was found between levels of FCONT and EPI (Fig. 5A). TC levels were lower for NRSE patients and PSRSE patients. Nevertheless, TC decrease hides different trends from the two subtypes of cholesterol: the free or unesterified cholesterol (FC), which is metabolically active, and the esterified cholesterol (EC), an inactive form stored in the liver. SE patients had lower EC levels when compared with CONT patients ($P < 0.001$). Notably, EC levels were lower for NRSE patients and PSRSE patients when compared with FCONT and EPI (Fig. 5B). The cholesterol esterification ratio, obtained as EC/TC, was also lower for SE patients ($P < 0.001$). In contrast, FC levels tend to rise in SE patients, especially for PSRSE patients ($P = 0.055$). We also observed a correlation between serum FC levels and the time between SE onset and blood sampling ($\rho = 0.44$; $P < 0.001$) (Fig. 5C).

3.5.2. Lipoproteins and apolipoproteins

We then studied changes in the lipid complexes. SE patients showed a decrease of HDL-c levels which was even stronger if SE was sustained ($P = 0.020$ for RSE patients versus FCONT; $P < 0.001$ for PSRSE patients versus FCONT and RSE patients) (Fig. 5D). Contrary to HDL-c, triglyceride levels increased in SE patients ($P = 0.0016$ for PSRSE patients versus CONT and $P = 0.019$ for PSRSE patients versus RSE patients). No correlation was observed between HDL-c and triglyceride levels (up to 2.5 g/L) in SE patients, indicating that lower HDL-c levels were not merely related to high triglyceride levels (Fig. 5E). ApoA1 levels were decreased in SE patients when compared with CONT ($P < 0.001$). No significant change was observed for ApoB levels.

3.5.3. Sterol levels in human plasma

The increase of FC levels could be linked to an increase of lanosterol ($P = 0.04$) (Fig. 5F), and dihydrolanosterol ($P = 0.0076$) (Fig. 5G) levels in PSRSE patients when compared with CONT. In contrast to the brain findings, no modification in desmosterol levels was found in plasma of SE patients (Fig. 5H).

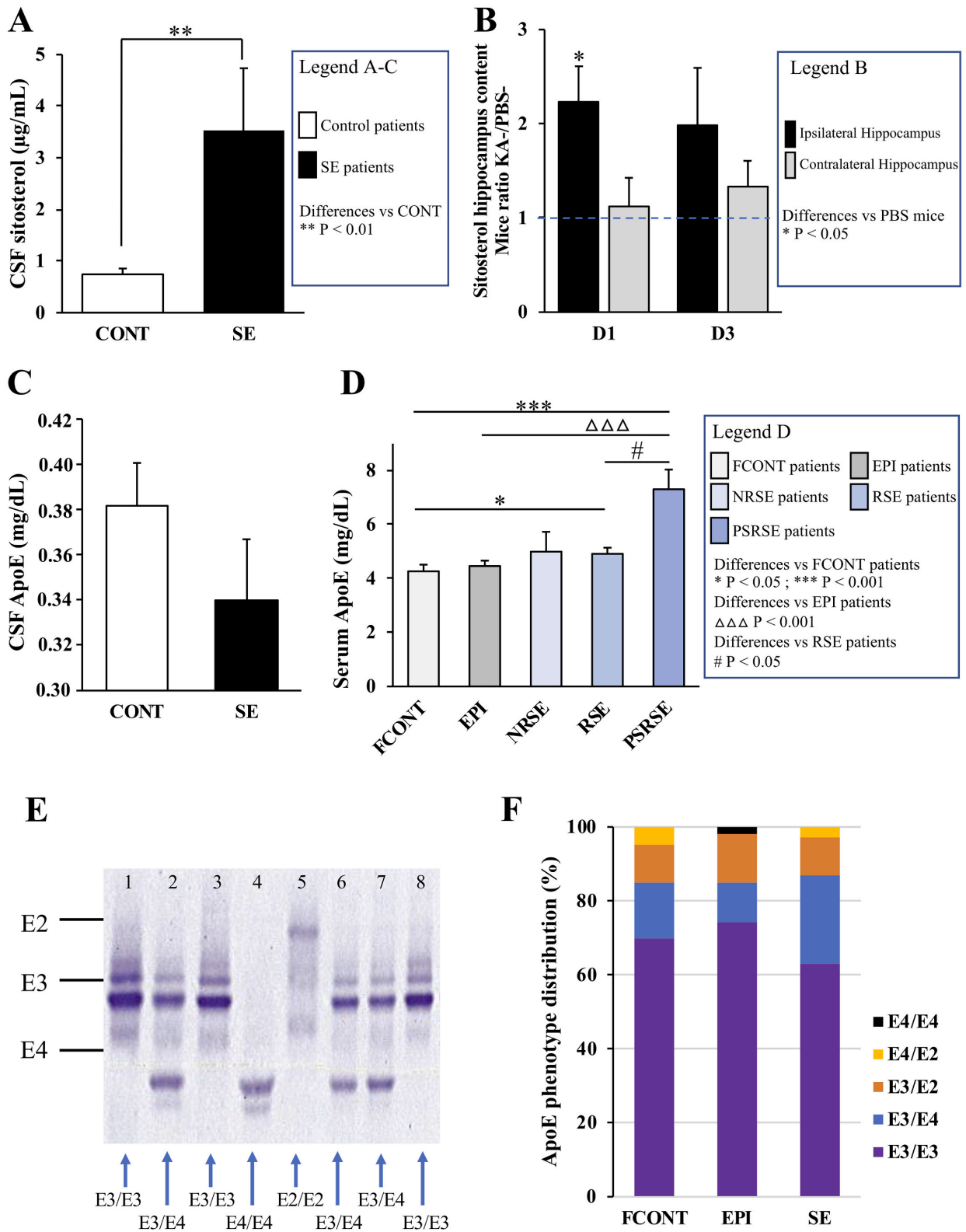
Altogether these data indicate that SE induces an abnormal increase of peripheral cholesterol synthesis through the Kandutsch-Russel pathway and disturbs cholesterol and lipoproteins homeostasis.

3.6. Blood – brain handover in SE

In order to understand relationship between the brain and the peripheral compartments, we further studied several ways of communication between them.

3.6.1. Blood-brain barrier permeability

To study BBB integrity, we measured sitosterol levels in humans and mice. SE patients showed increased CSF sitosterol levels when compared with CONT patients ($P = 0.0019$) (Fig. 6A), and an increased percentage of diffusion through the BBB (i.e. $[\text{Sitosterol}]_{\text{CSF}}/[\text{Sitosterol}]_{\text{CSF+plasma}}$) ($P < 0.001$). Moreover, hippocampus sitosterol levels were doubled, one



(caption on next page)

Fig. 6. Blood – brain handover in status epilepticus

(A) CSF sitosterol levels were measured in SE patients and CONT. (B) Sitosterol levels were measured in both ipsilateral hippocampus (black bars) and contralateral hippocampus (grey bars) from KA injected mice at the two first time points ($n = 6-7$ per time, per group). Data were normalized to those of PBS mice at each corresponding time points. (C) CSF ApoE levels were measured in FCONT and SE patients. (D) Serum ApoE levels were measured in FCONT, EPI, NRSE patients, RSE patients and PSRSE patients. (E) ApoE phenotype: examples of isoforms of ApoE for eight patients, by isoelectric focusing gel, followed by immunoprecipitation on Hydrigel 18 ApoE isofocusing. Results are indicated below the gel. (F) ApoE phenotype frequencies were determined for all FCONT, EPI and SE patients. Data are represented as mean \pm SEM; statistical analyses: Mann-Whitney test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ when compared with CONT or FCONT. $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ when compared with EPI. # $P < 0.05$ when compared with RSE patients.

day after injection, in KA mice when compared with control animals ($P = 0.029$) (Fig. 6B).

3.6.2. Lipid transport and ApoE

As ApoE is involved in the lipid transport from liver to peripheral compartments and from astrocytes to neurons, we measured its serum and CSF levels in patients. CSF ApoE levels tend to decrease in SE patients when compared with CONT ($P = 0.15$) (Fig. 6C). SE patients showed significantly higher serum ApoE levels when compared with CONT ($P = 0.0016$). We observed increased serum ApoE levels with SE duration (Fig. 6D). In addition, we observed a trend to an increase of hippocampal ApoE+ cells 7 days after KA injection (data not shown). Altogether these data suggest an increase of ApoE brain levels.

We further phenotyped ApoE in SE patients and CONT patients (Fig. 6E). The E3/E3 phenotype was the most common both in SE patients (63%) and CONT (73%) (Fig. 6F). We did not observe any difference between phenotype frequencies in both groups.

4. Discussion and conclusions

The availability of metabolites measurable in brain, blood or CSF may facilitate the understanding of cellular changes that occur during SE and the implementation of further prospective therapeutic studies. Even if several fluid biomarkers were proposed in SE, none have yet been validated for clinical use (Hanin et al., 2020).

Disturbances in brain cholesterol homeostasis were reported in several neurological disorders such as Alzheimer's disease (Djelti et al., 2015; Martins et al., 2009) or Huntington's disease (Boussicault et al., 2016) and suggested in SE animal models (Chali et al., 2019; Heverin et al., 2012; Kim et al., 2010; Ong et al., 2010). Nevertheless, findings were conflicting and brain cholesterol homeostasis has never been explored in SE patients. We therefore aimed to evaluate more accurately brain cholesterol homeostasis disturbances induced by SE in both patients and animal model.

4.1. CYP46A1 expression is maintained but 24-OHc levels decrease during SE

We did not observe a decrease of CYP46A1 expression in the brain of patients with SE (Fig. 3H–I). Nevertheless, in lines with previous studies conducted on neurodegenerative diseases, we observed two-step changes of 24-OHc levels—an initial decrease (Leoni et al., 2008; Solomon et al., 2009), followed by an increase (Lütjohann et al., 2000).

Indeed, the 24-OHc/CYP46A1 ratio was lower than that of controls in subiculum for the patient who died early (9 days) after SE onset (Fig. 3A). We observed decreased 24-OHc levels in mouse hippocampi, 1 and 3 days after KA injection (Fig. 3G), as well as in plasma from patients who were enrolled shortly after SE onset (Fig. 3D–F). SE may induce a CYP46A1 functional inhibition, possibly related to (i) a dysfunction of the CYP46A1 intracellular transfer between endoplasmic reticulum and membranes (Sodero et al., 2012), (ii) an increased requirement for brain cholesterol after injury or (iii) a protective mechanism against 24-OHc neurotoxicity (Noguchi et al., 2015, 2014; Paul et al., 2013; Yamana et al., 2011). Decreased 24-OHc production could induce an increased production of 25-OHc, via an alternative way of hydroxylation. Increased levels of 25-OHc are involved in inflammation pathways (Pokharel et al., 2019) and may participate to SE excitotoxicity. No

difference of 24-OHc levels was found in CSF. Measurement of 24-OHc in CSF was previously shown to give less accurate findings: the CSF compartment may accumulate compounds and reflect an averaged production and release, and repeated measures are difficult to obtain (Leoni and Caccia, 2011).

The secondary increase in 24-OHc levels was reported to result from neuronal loss and a wide release of molecules from the brain into the blood (Leoni and Caccia, 2011; Lütjohann et al., 2000). We showed an increase of the subiculum 24-OHc/CYP46A1 ratio for the patient who presented with hippocampal atrophy at brain examination, highlighting a focal neuronal death (Fig. 3A). No increase was shown in both cortex (Fig. 3B–C), possibly explained by the lack of cortical atrophy. We also reported increased 24-OHc levels for SE patients who were enrolled later after SE onset (Fig. 3D–F). These patients presented with SE for several days; therefore, we may hypothesize that neuronal death had already begun.

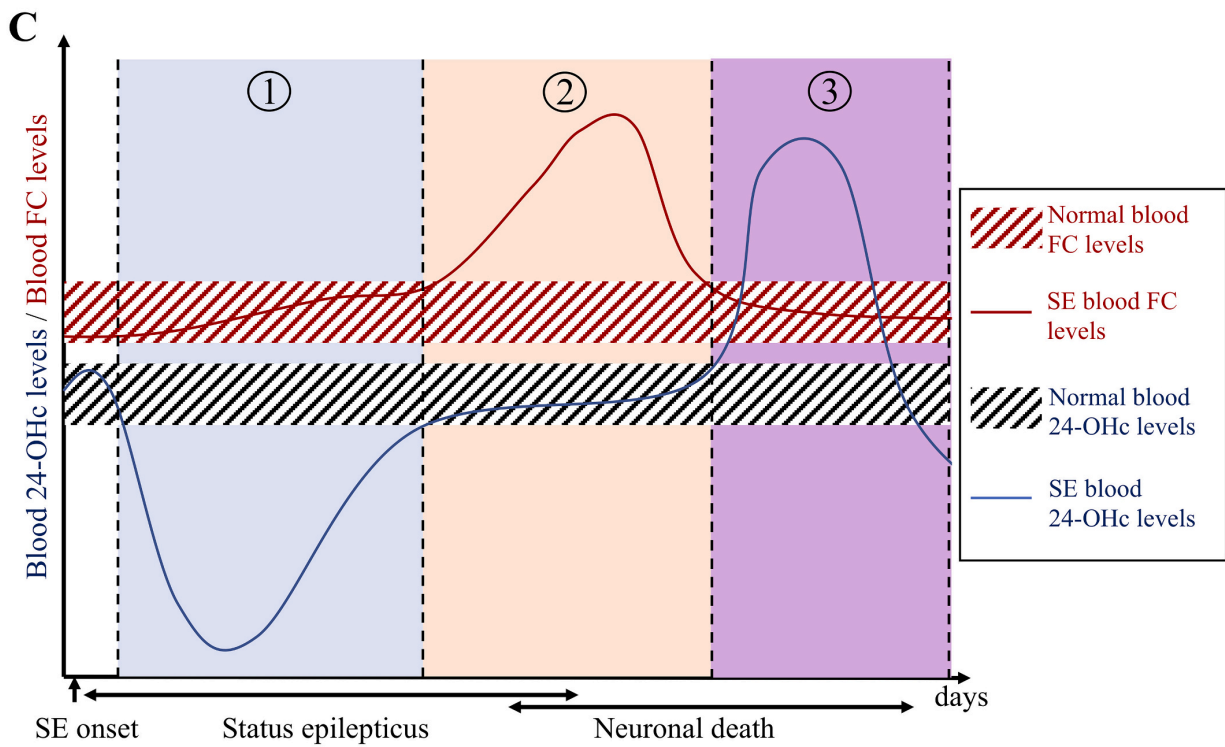
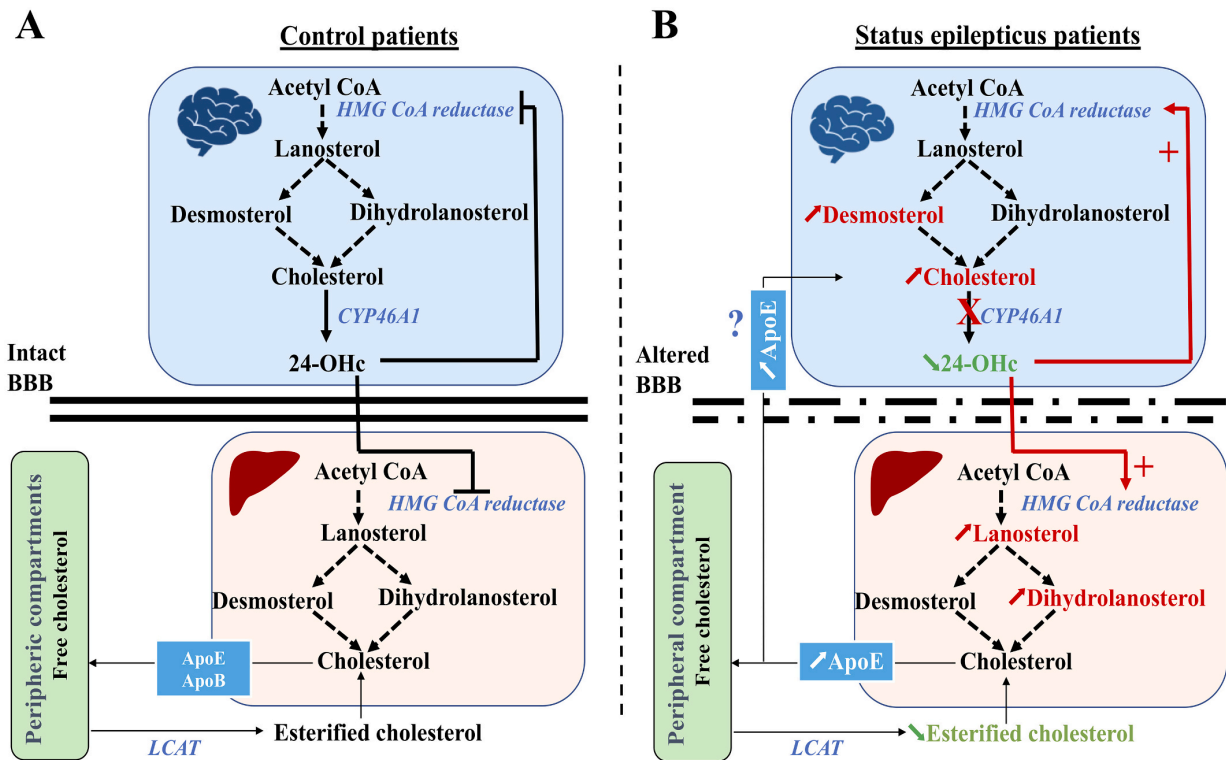
This two-stage evolution of 24-OHc emphasizes the need of a precise timing of blood sampling, referred to SE onset to correctly interpret this variable (Fig. 7). We can identify three periods: (1) first hours/days after SE onset, 24-OHc levels decrease; (2) several days after, 24-OHc levels normalize; (3) in patients and/or animals with sustained SE, suffering from secondary neuronal death, 24-OHc is finally released from the brain into the blood.

4.2. 24-OHc decreased levels are followed by an abnormal increase of cholesterol synthesis

The cholesterol synthesis and the 24-OHc production are closely related (Fig. 7). Accordingly, we showed that decreased 24-OHc levels were associated with increased cholesterol levels.

Furthermore, we showed that increased cholesterol levels did not merely result from the blockage of the CYP46A1 enzymatic activity, but also resulted from an increase of the cholesterol synthesis. Desmosterol and cholesterol levels were higher in the subiculum of the patient who had the lowest 24-OHc/CYP46A1 ratio (Fig. 4B). Increased cholesterol synthesis could reflect the lack of a negative feedback mechanism triggered by 24-OHc on the cholesterol synthesis enzymes (Boussicault et al., 2016; Chali et al., 2019; Leoni and Caccia, 2013). The activation of cholesterol enzymes by transcription-translation occurred after several days, which could explain why only PSRSE patients presented with higher FC levels (Fig. 5C, period 2 Fig. 7C). A too early blood sampling does not measure the increase in the cholesterol synthesis (period 1 Fig. 7C).

Two alternative pathways for cholesterol synthesis exist downstream of lanosterol: the Bloch and the Kandutsch-Russel pathway (Mitsche et al., 2015). Interestingly, we observed an increase of the cholesterol synthesis through two different pathways according to the compartment: (i) in brain, an increase of desmosterol levels both in human and mouse brains and in human CSF, through the Bloch pathway (Fig. 4); and (ii) in the peripheral compartment, an increase of lanosterol and dihydrolanosterol levels in human plasma, through the Kandutsch-Russel pathway (Fig. 5F–G). Adult neurons essentially rely on astrocytes for cholesterol synthesis, which could explain the increase in the brain Bloch pathway activity. Altogether these data suggest that SE induces an abnormal increase of cholesterol synthesis in brain and in peripheral compartment.



(caption on next page)

Fig. 7. Cholesterol homeostasis is modified in status epilepticus.

(A) Schema of cholesterol homeostasis regulation by the CYP46A1 in normal situation. 24-OHc controls the synthesis of cholesterol both in the brain and in the liver. Lipids synthesized in the liver are transported thanks to ApoE and ApoB to the peripheral compartments to be stored and used for biosynthesis. Free cholesterol must be esterified by LCAT enzyme to go back to the liver. (B) Cholesterol homeostasis is dysregulated in SE. Due to CYP46A1 inhibition, an increase of cholesterol synthesis occurs in the brain *via* the Bloch pathway stimulation and in the peripheral compartment *via* the Kandutsch-Russel pathway stimulation. The increase of serum apolipoprotein E (ApoE) could allow the transport of lipids from the liver into the brain *via* an altered blood-brain barrier. (C) Proposed time-evolution of free cholesterol (FC) and 24-OHc levels after SE. We distinguish three periods: (1) during the first hours/days after SE onset, we found a decrease of 24-OHc levels, probably related to the transitory CYP46A1 inhibition, and normal FC levels; (2) several days after SE onset, we showed increased FC levels due to the lack of negative feedback mechanism triggered by 24-OHc on the cholesterol synthesis enzymes and normalization of 24-OHc levels; (3) in case of sustained SE, patients or animals suffered from neuronal death which induces an increase of 24-OHc release.

4.3. Disturbances in peripheral cholesterol homeostasis and lipid transport

When low-density lipoprotein (LDL) particles are overloaded in the blood stream, lipids synthesized in the liver are transported thanks to ApoE/ApoB to the peripheral compartments. In contrast, high-density lipoprotein (HDL) particles transport cholesterol back to the liver after esterification by LCAT enzyme (Zhang and Liu, 2015). Brain transcripts for esterification enzymes increased persistently after SE onset in mice (Chali et al., 2019). However, we observed a decrease of serum EC and cholesterol esterification ratio in patients, which may result in a default to eliminate FC stored in peripheral compartments (Fig. 5B).

After an injury, increased mobilization of cholesterol may be required for repair, growth and maintenance of myelin and neurons membranes (Wang et al., 2010). We observed increased sitosterol levels both in mouse hippocampi and human CSF. These data suggest that BBB is altered after SE and so, a cholesterol blood-brain handover could happen. We showed that PSRSE patients presented with the highest serum ApoE and ApoB levels, the lowest EC levels and the highest sitosterol CSF levels. We can speculate that the non-esterified cholesterol could be transported by apolipoproteins to the brain through an altered BBB (Fig. 7).

Altogether, these data may suggest that cholesterol may be actively concentrated after SE. This may first be beneficial for the restoration of lipid membranes. On the other hand, in case of sustained SE, the excess of cholesterol may be excitotoxic for neuronal cells, as shown by the complete blockage of the CYP46A1 (Chali et al., 2015). The cholesterol accumulation could result in an increase of membrane viscosity and a decrease of neurotransmitter receptors mobility out of synapses, thereby increasing excitotoxicity and focal neuronal death. It may explain the neurologic sequels observed in SE patients and promote the use of cholesterol-lowering drugs that have previously shown their capability to reduce the association of NMDA receptor to lipid rafts in neuronal cultures, thereby decreasing the neurotoxicity (Ponce et al., 2008). Excitotoxicity could also be related to a direct regulation of numerous voltage-dependent and ligand-gated ion channels by cholesterol (Korinek et al., 2015; Paul et al., 2013).

In summary, our findings reveal disturbances in cholesterol homeostasis, similar in humans and in mouse model of SE, both in brain and in peripheral compartments (summarized in Fig. 7A–B). The accumulation of cholesterol was previously shown to be responsible for neuronal death in animal models and *in vitro*. In this study, we demonstrated that SE induces an increase of the cholesterol synthesis both in humans and mice. Nevertheless, the prognosis significance of the increase of cholesterol synthesis remain to be explored in SE patients. If we demonstrate that disturbances of cholesterol homeostasis are associated with higher morbidity, the deleterious increase of brain cholesterol synthesis could be targeted by statins. Simvastatin has the highest BBB permeability (Sierra et al., 2011; Xie et al., 2011). Some studies conducted in rodents suggested a neuroprotective effect of simvastatin (Ponce et al., 2008; Xie et al., 2011; Zacco et al., 2003). Nonetheless, mechanisms underlying the neuroprotective effect of simvastatin are unknown (Omar et al., 2017; Quintana-Pájaro et al., 2018), and other studies did not report any effect (Funck et al., 2011; Trivedi et al., 2018).

Our study paves the way for research on statins as therapeutic intervention, in order to prevent the excitotoxicity and possibly

subsequent neurological sequels of SE patients.

There are some limitations for this study: it was conducted in a single center, with various SE etiologies and treatments. Lumbar puncture was not performed for all patients and CSF was obtained more commonly for the patients with the most severe disease. Due to the smaller number of patients, we were not able to perform pairwise comparisons for CSF, and statistical analysis for the post-mortem samples. The interpretation of human post-mortem findings is limited by the small number of patients.

Nonetheless, the strengths of our study were the translational approach showing similar results for humans and KA mice, and the detailed analysis of lipid homeostasis by complementary methods. In addition, it was seemingly the first study demonstrating disturbances of cholesterol homeostasis in SE patients.

Funding sources

This work received support from the “Investissements d’avenir” program ANR-10-IAIHU-06, from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FDM20170839111) and from the Fondation Assitance Publique-Hôpitaux de Paris (EPIRES- Marie Laure PLV Merchandising).

All animal work was conducted at the PHENO-ICMice facility. The Core is supported by 2 “Investissements d’avenir” (ANR-10-IAIHU-06 and ANR-11-INBS-0011-NeurATRIS) and the “Fondation pour la Recherche Médicale”.

Study Group

Aurélien Hanin^a, Paul Baudin^a, Sophie Demeret^b, Delphine Roussel^a, Sarah Lecas^a, Elisa Teyssou^a, Maria Damiano^c, David Luis^a, Virginie Lambrecq^{a,c,d}, Valerio Frazzini^{a,c}, Maxens Decavèle^{e,f}, Isabelle Plu^{d,g}, Dominique Bonnefont-Rousselot^{h,i}, Randa Bittar^{h,j}, Foudil Lamari^h, Vincent Navarro^{a,c,d,k}, Morgane Faure^f, Bastien Herlin^c, Pierre Jaquet^b, Clémence Marois^b, Nicolas Mezouar^c, Benjamin Rohaut^{a,b,d}, Nicolas Weiss^b, Mark Williams (Department of Neurology, Yale School of Medicine, New Haven, United States).

Declaration of competing interest

Aurélien Hanin reports no disclosure.
 Paul Baudin reports no disclosure.
 Sophie Demeret reports no disclosure.
 Delphine Roussel reports no disclosure.
 Sarah Lecas reports no disclosure.
 Elisa Teyssou reports no disclosure.
 Maria Damiano reports no disclosure.
 David Luis reports no disclosure.
 Virginie Lambrecq reports no disclosure.
 Valerio Frazzini reports no disclosure.
 Maxens Decavèle reports no disclosure.
 Isabelle Plu reports no disclosure.
 Dominique Bonnefont-Rousselot reports no disclosure.
 Randa Bittar reports no disclosure.
 Foudil Lamari reports no disclosure.
 Vincent Navarro reports personal fees from UCB pharma, EISAI, GW Pharma and Liva Nova outside the submitted work.

Acknowledgements

The authors thank all the technical staff from the Histomics facility and from the PHENO-ICMice facility (Paris Brain Institute).

References

Bittar, R., Carrié, A., Nouadje, G., Cherfils, C., Fesl-Fouquier, V., Barbot-Trystram, L., Giral, P., Bonnefont-Rousselot, D., 2020. Evaluation of a semi-automatic isoelectric focusing method for apolipoprotein E phenotyping. *Pract. Lab. Med.* 18, e00150 <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2019.e00150>.

Björkhem, I., Meaney, S., 2004. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 806–815. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b>.

Björkhem, I., Lütjohann, D., Diczfalusy, U., Ståhle, L., Ahlborg, G., Wahren, J., 1998. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J. Lipid Res.* 39, 1594–1600.

Boussicault, L., Alves, S., Lamazière, A., Planques, A., Heck, N., Moumné, L., Despres, G., Bolte, S., Hu, A., Pagès, C., Galvan, L., Pigué, F., Aubourg, P., Cartier, N., Caboche, J., Bétuing, S., 2016. CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington’s disease. *Brain* 139, 953–970. <https://doi.org/10.1093/brain/aww384>.

Chali, F., Djelti, F., Eugene, E., Valderrama, M., Marquer, C., Aubourg, P., Duykaerts, C., Miles, R., Cartier, N., Navarro, V., 2015. Inhibiting cholesterol degradation induces neuronal sclerosis and epileptic activity in mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 41, 1345–1355. <https://doi.org/10.1111/ejn.12911>.

Chali, F., Milior, G., Marty, S., Morin-Brureau, M., Le Duigou, C., Savary, E., Blugeon, C., Jourden, L., Miles, R., 2019. Lipid markers and related transcripts during excitotoxic neurodegeneration in kainate-treated mice. *Eur. J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1111/ejn.14375>.

Cuschieri, S., 2019. The STROBE guidelines. *Saudi J Anaesth* 13, S31–S34. <https://doi.org/10.4103/sja.SJA.543.18>.

de Freitas, R.M., do Nascimento, K.G., Ferreira, P.M.P., Jordán, J., 2010. Neurochemical changes on oxidative stress in rat hippocampus during acute phase of pilocarpine-induced seizures. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.09.015>.

Dietschy, J.M., Turley, S.D., 2004. Thematic review series: brain lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* 45, 1375–1397. <https://doi.org/10.1194/jlr.R400004-JLR200>.

Djelti, F., Braudeau, J., Hudry, E., Dhenain, M., Varin, J., Bièche, I., Marquer, C., Chali, F., Aycirix, S., Auzeil, N., Alves, S., Langui, D., Potier, M.-C., Laprevote, O., Vidaud, M., Duykaerts, C., Miles, R., Aubourg, P., Cartier, N., 2015. CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer’s disease. *Brain* 138, 2383–2398. <https://doi.org/10.1093/brain/awv166>.

Funck, V.R., de Oliveira, C.V., Pereira, L.M., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Royes, L.F.F., Ferreira, J., Guerra, G.P., Furian, A.F., Oliveira, Mauricio Schneider, Mallmann, C.A., de Mello, C.F., Oliveira, Mauro Schneider, 2011. Differential effects of atorvastatin treatment and withdrawal on pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia* 52, 2094–2104. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03261.x>.

Hanin, A., Lambrecq, V., Denis, J.A., Imbert-Bismut, F., Rucheton, B., Lamari, F., Bonnefont-Rousselot, D., Demeret, S., Navarro, V., 2020. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus. *Epilepsia* 61, 6–18. <https://doi.org/10.1111/epl.16405>.

Heverin, M., Bogdanovic, N., Lütjohann, D., Bayer, T., Pikuleva, I., Bretillon, L., Diczfalusy, U., Winblad, B., Björkhem, I., 2004. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer’s disease. *J. Lipid Res.* 45, 186–193. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300320-JLR200>.

Heverin, M., Engel, T., Meaney, S., Jimenez-Mateos, E.M., Al-Saudi, R., Henshall, D.C., 2012. Bi-lateral changes to hippocampal cholesterol levels during epileptogenesis and in chronic epilepsy following focal-onset status epilepticus in mice. *Brain Res.* 1480, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.08.018>.

Hirsch, L.J., Gaspard, N., van Baalen, A., Nabbut, R., Demeret, S., Loddenkemper, T., Navarro, V., Specchio, N., Lagae, L., Rossetti, A.O., Hocker, S., Gofton, T.E., Abend, N.S., Gilmore, E.J., Hahn, C., Khosravani, H., Rosenow, F., Trinka, E., 2018. Proposed consensus definitions for new-onset refractory status epilepticus (NORSE), febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES), and related conditions. *Epilepsia* 59, 739–744. <https://doi.org/10.1111/epl.14016>.

Kim, J.-H., Jittiwat, J., Ong, W.-Y., Farooqui, A.A., Jenner, A.M., 2010. Changes in cholesterol biosynthetic and transport pathways after excitotoxicity. *J. Neurochem.* 112, 34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06449.x>.

Korinek, M., Vyklicky, V., Borovska, J., Lichnerova, K., Kaniakova, M., Krausova, B., Krusek, J., Balik, A., Smejkalova, T., Horak, M., Vyklicky, L., 2015. Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors. *J. Physiol. Lond.* 593, 2279–2293. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.288209>.

Le Duigou, C., Boullieret, V., Miles, R., 2008. Epileptiform activities in slices of hippocampus from mice after intra-hippocampal injection of kainic acid. *J. Physiol. Lond.* 586, 4891–4904. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.156281>.

Leoni, V., Caccia, C., 2011. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem. Phys. Lipids* 164, 515–524. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.04.002>.

Leoni, V., Caccia, C., 2013. 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. *Biochimie* 95, 595–612. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.025>.

Leoni, V., Mariotti, C., Tabrizi, S.J., Valenza, M., Wild, E.J., Henley, S.M.D., Hobbs, N.Z., Mandelli, M.L., Grisoli, M., Björkhem, I., Cattaneo, E., Di Donato, S., 2008. Plasma 24S-hydroxycholesterol and caudate MRI in pre-manifest and early Huntington’s disease. *Brain* 131, 2851–2859. <https://doi.org/10.1093/brain/awn212>.

Levitan, I., Singh, D.K., Rosenhouse-Dantsker, A., 2014. Cholesterol binding to ion channels. *Front. Physiol.* 5, 65. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00065>.

Lütjohann, D., Papassotiropoulos, A., Björkhem, I., Locatelli, S., Bagli, M., Oehring, R.D., Schlegel, U., Jessen, F., Rao, M.L., von Bergmann, K., Heun, R., 2000. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J. Lipid Res.* 41, 195–198.

Marelli, C., Lamari, F., Rainteau, D., Lafourcade, A., Banneau, G., Humbert, L., Monin, M.-L., Petit, E., Debs, R., Castelnuovo, G., Ollagnon, E., Lavie, J., Pilliod, J., Coupry, I., Babin, P.J., Guissart, C., Benyounes, I., Ullmann, U., Lesca, G., Thauvin-Robinet, C., Labauge, P., Odent, S., Ewencyk, C., Wolf, C., Stevanin, G., Hajage, D., Durr, A., Goizet, C., Mochel, F., 2018. Plasma oxysterols: biomarkers for diagnosis and treatment in spastic paraplegia type 5. *Brain* 141, 72–84. <https://doi.org/10.1093/brain/awx297>.

Martins, I.J., Berger, T., Sharman, M.J., Verdile, G., Fuller, S.J., Martins, R.N., 2009. Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.* 111, 1275–1308. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06408.x>.

Mitsche, M.A., McDonald, J.G., Hobbs, H.H., Cohen, J.C., 2015. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife* 4, e07999. <https://doi.org/10.7554/eLife.07999>.

Noguchi, N., Saito, Y., Urano, Y., 2014. Diverse functions of 24(S)-hydroxycholesterol in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 692–696. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.010>.

Noguchi, N., Urano, Y., Takabe, W., Saito, Y., 2015. New aspects of 24(S)-hydroxycholesterol in modulating neuronal cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 87, 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.036>.

Omar, A.S., Hanoura, S., Al-Janubi, H.M., Mahfouz, A., 2017. Statins in critical care: to give or not to give? *Minerva Anesthesiol.* 83, 502–511. <https://doi.org/10.23736/S0375-9393.16.11493-2>.

Ong, W.-Y., Kim, J.-H., He, X., Chen, P., Farooqui, A.A., Jenner, A.M., 2010. Changes in brain cholesterol metabolome after excitotoxicity. *Mol. Neurobiol.* 41, 299–313. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8099-3>.

Paul, S.M., Doherty, J.J., Robichaud, A.J., Belfort, G.M., Chow, B.Y., Hammond, R.S., Crawford, D.C., Linsenhardt, A.J., Shu, H.-J., Izumi, Y., Mennerick, S.J., Zorumski, C. F., 2013. The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurosci.* 33, 17290–17300. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2619-13.2013>.

Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M., Topple, A., 1985. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J. Neurosci. Methods* 13, 139–143.

Pokhare, S.M., Shil, N.K., Ge, J.B., Colburn, Z.T., Tsai, S.-Y., Segovia, J.A., Chang, T.-H., Bandyopadhyay, S., Natesan, S., Jones, J.C.R., Bose, S., 2019. Integrin activation by the lipid molecule 25-hydroxycholesterol induces a proinflammatory response. *Nat. Commun.* 10, 1482. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09453-x>.

Ponce, J., de la Ossa, N.P., Hurtado, O., Millan, M., Arenillas, J.F., Dávalos, A., Gasull, T., 2008. Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke* 39, 1269–1275. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.498923>.

Quintana-Pájaro, L.D.J., Ramos-Villegas, Y., Cortecero-Sabalza, E., Joaquim, A.F., Agrawal, A., Narvaez-Rojas, A.R., Moscote-Salazar, L.R., 2018. The effect of statins in epilepsy: a systematic review. *J. Neurosci. Rural Pract.* 9, 478–486. <https://doi.org/10.4103/jnrp.jnrp.110.18>.

Ramirez, D.M.O., Andersson, S., Russell, D.W., 2008. Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 507, 1676–1693. <https://doi.org/10.1002/cne.21605>.

Rossetti, A.O., Lowenstein, D.H., 2011. Management of refractory status epilepticus in adults: still more questions than answers. *Lancet Neurol.* 10, 922–930. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70187-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70187-9).

Rossetti, A.O., Logroscino, G., Bromfield, E.B., 2006. A clinical score for prognosis of status epilepticus in adults. *Neurology* 66, 1736–1738. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000223352.71621.97>.

Saeed, A.A., Genové, G., Li, T., Hülshorst, F., Betsholtz, C., Björkhem, I., Lütjohann, D., 2015. Increased flux of the plant sterols campesterol and sitosterol across a disrupted blood brain barrier. *Steroids* 99, 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.02.005>.

Sierra, S., Ramos, M.C., Molina, P., Esteo, C., Vázquez, J.A., Burgos, J.S., 2011. Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *J. Alzheimers Dis.* 23, 307–318. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101179>.

Sodero, A.O., Vriens, J., Ghosh, D., Stegner, D., Brachet, A., Pallotto, M., Sassoé-Pognetto, M., Brouwers, J.F., Helms, J.B., Nieswandt, B., Voets, T., Dotti, C.G., 2012. Cholesterol loss during glutamate-mediated excitotoxicity. *EMBO J.* 31, 1764–1773. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.31>.

Solomon, A., Leoni, V., Kivipelto, M., Besga, A., Oksengård, A.R., Julin, P., Svensson, L., Wahlund, L.-O., Andreassen, N., Winblad, B., Soininen, H., Björkhem, I., 2009. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer’s disease. *Neurosci. Lett.* 462, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.073>.

- Trinka, E., Kälviäinen, R., 2017. 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. *Seizure* 44, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.11.001>.
- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A.O., Scheffer, I.E., Shinnar, S., Shorvon, S., Lowenstein, D.H., 2015. A definition and classification of status epilepticus—report of the ILAE task force on classification of status epilepticus. *Epilepsia* 56, 1515–1523. <https://doi.org/10.1111/epi.13121>.
- Trivedi, L.U., Alvarez, C.A., Mansi, I.A., 2018. Association of statin therapy with risk of epilepsy in 2 propensity score-matched cohorts. *Ann. Pharmacother.* 52, 546–553. <https://doi.org/10.1177/1060028018756650>.
- Wang, L., Han, Y., Chen, D., Xiao, Z., Xi, Z., Xiao, F., Wang, X., 2010. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E concentration decreases after seizure. *Seizure* 19, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2009.12.001>.
- Xie, C., Sun, J., Qiao, W., Lu, D., Wei, L., Na, M., Song, Y., Hou, X., Lin, Z., 2011. Administration of simvastatin after kainic acid-induced status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. *PLoS One* 6, e24966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024966>.
- Yamanaka, K., Saito, Y., Yamamori, T., Urano, Y., Noguchi, N., 2011. 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J. Biol. Chem.* 286, 24666–24673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.236273>.
- Zacco, A., Togo, J., Spence, K., Ellis, A., Lloyd, D., Furlong, S., Piser, T., 2003. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J. Neurosci.* 23, 11104–11111.
- Zhang, J., Liu, Q., 2015. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* 6, 254–264. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0131-3>.

2. Une approche non ciblée : étude de métabolomique

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le département Médicaments et Technologies pour la Santé du CEA de Saclay (Dr Florence Castelli, Dr Céline Chollet).

2.1. Introduction

Les EME s'accompagnent de nombreuses modifications cellulaires et moléculaires, qui surviennent de façon progressive et peuvent être responsables d'une excitotoxicité (Motti et al. 2010). L'EME peut entraîner l'activation de différentes voies métaboliques qui favorisent l'apparition d'une mort neuronale, d'une atrophie cérébrale, de séquelles neurologiques et d'une épilepsie séquellaire. Il a notamment été décrit, dans des modèles animaux, que l'EME s'accompagnait d'une consommation accrue d'énergie, d'une excitotoxicité médiée par le glutamate et de modifications des métabolismes de neurotransmetteurs et de neuromédiateurs (Fauvelle et al. 2010; Tan et al. 2019; Beamer et al. 2021; Miljanovic et al. 2021). De plus, comme nous l'avons vu précédemment, l'EME s'accompagne également de modifications de l'homéostasie du cholestérol cérébral et périphérique et d'une accumulation de cholestérol dans les neurones (Chali et al. 2019; Hanin et al. 2021). L'accumulation de cholestérol dans les neurones pourrait expliquer une partie des conséquences délétères de l'EME (Chali et al. 2015, 2019).

La compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie et la toxicité de l'EME est cruciale pour identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de prévenir l'apparition des lésions cérébrales et les séquelles neurologiques associées. Cependant, aucune étude non ciblée n'a été conduite, chez l'Homme, pour évaluer l'impact de l'EME sur l'ensemble des métabolismes. Les études de métabolomique sont un outil clé pour détecter les métabolismes altérés et pourraient permettre d'identifier les voies métaboliques associées aux conséquences de l'EME. La métabolomique consiste à analyser l'ensemble des petites molécules (de poids moléculaire inférieur à 1500 Da) présentes dans les tissus, cellules, sang, LCR ou autres échantillons biologiques (Wishart et al. 2007; Sévin et al. 2015). Bien que le tissu cérébral soit souvent considéré comme le « *gold standard* » pour l'étude des voies physiopathologiques impliquées dans les maladies neurologiques (Kim et al. 2019), de nombreux lipides et protéines présentent des concentrations altérées dans le sang et dans le LCR des patients en EME, justifiant l'intérêt d'une recherche conduite sur ces liquides (Hanin et al. 2020).

Dans cette étude, nous avons eu pour objectifs d'identifier, par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (UHPLC-HRMS), les métabolites sur ou sous-exprimés dans le sang et dans le LCR de patients en EME, en comparaison à une population contrôle, et de discriminer les voies métaboliques les plus impactées.

2.2. Démarche expérimentale

*** Population d'étude**

Nous avons inclus prospectivement des patients en EME et des patients contrôles au sein des unités de réanimation et du département de Neurologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, entre février 2013 et mars 2020.

L'EME devait être en cours ou s'être arrêté depuis moins de 24 heures. L'EME a été défini en accord avec la définition de l'ILAE (Trinka and Kälviäinen 2017).

Nous avons également recruté des patients contrôles, âgés de plus de 16 ans, qui étaient hospitalisés dans les unités de neurologie pour un bilan d'épilepsie ou pour l'exploration de troubles fonctionnels ou de troubles périphériques et avaient une ponction lombaire normale.

Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique local (CPP Paris VI 2012) et par l'Inserm (C16-16, 2015482).

*** Collection d'échantillons de sang et de LCR**

Des échantillons de sang ont été collectés chez 78 patients en EME et 107 patients contrôles. Du LCR a été collecté pour 29 patients en EME et 29 patients contrôles, lors de ponctions lombaires réalisées uniquement dans le cadre de la prise en charge clinique.

*** Réactifs**

L'ensemble des réactifs analytiques utilisés provenaient du laboratoire Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Les standards utilisés pour la calibration du spectromètre de masse (Calmix-positive pour l'analyse en ions positifs, Calmix-negative pour l'analyse en ions négatifs) provenaient de Thermo Fischer Scientific (Courtaboeuf, France). L'acétonitrile provenait de SDS (Peypin, France), l'acide formique de Merck (Briare-le-Canal, France), le méthanol de VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France) et l'eau milliQ de Biosolve Chemicals (Dieuse, France).

* Extraction des métabolites

Les métabolites plasmatiques ont été extraits à partir de 50 μL de plasma par précipitation au méthanol (Boudah et al. 2014). Pour cela, 200 μL d'une solution de méthanol contenant 3,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de standards internes (Dimetridazole, acide 2-amino-3-(3-hydroxy-5-méthyl-isoxazol-4-yl) propanoïque, acide 2-méthyl-4-chlorophenoxyacétique, Dinoseb (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France)) ont été ajoutés aux 50 μL de plasma. Les solutions obtenues ont été conservées dans un bain de glace pendant 90 minutes, jusqu'à précipitation complète des protéines.

Après une centrifugation à 20 000 g pendant 15 minutes, à 4°C, les surnageants ont été collectés et séchés sous un flux d'azote. Les résidus secs ont été conservés à -80°C jusqu'à analyse.

Préalablement aux analyses UHPLC-HRMS, les résidus secs ont été resuspendus dans :

- 150 μL d'un mélange d'eau (95%) et d'acétonitrile (5%), contenant 0,1% d'acide formique, pour les analyses avec la colonne C18.
- 150 μL d'une solution mixte de carbonate d'ammonium à 10 mM pH 10,5 (40%) et d'acétonitrile (60%), pour les analyses avec la colonne HILIC.

Les solutions obtenues ont été placées dans des vials avec inserts de 200 μL pour analyse.

Les échantillons de LCR ont été directement analysés en UHPLC-HRMS après décongélation à température ambiante. 50 μL de LCR ont été ajoutés à :

- 100 μL d'un mélange d'eau (95%) et d'acétonitrile (5%), contenant 0,1% d'acide formique, pour les analyses avec la colonne C18.
- 100 μL d'une solution mixte de carbonate d'ammonium à 10 mM pH 10,5 (40%) et d'acétonitrile (60%), pour les analyses avec la colonne HILIC.

Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 20 000 g pendant 15 minutes à 4°C puis un volume de 95 μL de surnageant a été transféré dans une vial avec inserts de 200 μL pour analyse.

Une solution de standards a été ajoutée dans chacune des vials afin de vérifier la stabilité du signal et des temps de rétention pendant l'expérience. De même, un mélange contrôle qualité a été préparé en mélangeant 20 μL de chacun des échantillons de patients. Cette solution contrôle a été passée tous les 10 échantillons afin d'évaluer les variations du signal pour l'ensemble des métabolites.

*** Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse haute résolution**

Une analyse par chromatographie liquide a été réalisée à l'aide des colonnes Hypersil GOLD C18 (1,9 μm , 2,1 mm x 150 mm, 30°C, Thermo Fisher Scientific, les Ulis, France) et Sequant ZICpHILIC (5 μm , 2,1 mm x 150 mm, 15°C, Merck, Darmstadt, Allemagne). La colonne Hypersil GOLD C18 permet de retenir les métabolites apolaires. La colonne Sequant ZICpHILIC permet de retenir les métabolites polaires.

Pour les analyses conduites sur la colonne C18, nous avons utilisé les paramètres suivants :

- Phase mobile A : 100% d'eau et 0,1% d'acide formique,
- Phase mobile B : 100% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique,
- Gradient d'élution : 500 $\mu\text{L}/\text{minute}$, 2 minutes à 5% de B puis une augmentation linéaire jusqu'à 100% de B en 11 minutes. Les proportions ont ensuite été gardées constantes pendant 12,5 minutes avant de rééquilibrer la colonne avec les conditions initiales.

Pour les analyses conduites sur la colonne HILIC, nous avons utilisé les paramètres suivants :

- Phase mobile A : solution de carbonate d'ammonium à 10 mM ajustée à un pH de 10,5 avec de l'hydroxyde d'ammonium,
- Phase mobile B : 100% d'acétonitrile,
- Gradient d'élution : 200 $\mu\text{L}/\text{minute}$, 2 minutes à 80% de B puis une diminution linéaire jusqu'à 40% de B en 10 minutes. Le système chromatographique a ensuite été rincé pendant 5 minutes avec 0% de B et le cycle s'est terminé par un rééquilibrage de la colonne avec les conditions initiales.

Nous avons utilisé le chromatographe U3000 couplé au spectromètre de masse Exactive (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Le spectromètre de masse a été utilisé avec une tension capillaire de -3 kV en mode d'ionisation négative et de 5 kV en mode d'ionisation positive, avec une température capillaire fixée à 280°C. La pression du gaz de la gaine et la pression du gaz auxiliaire ont été respectivement fixées à 60 et 10 unités arbitraires avec de l'azote gazeux. Le pouvoir de résolution de l'analyseur de masse était de 50 000 et les pics ont pu être détectés si leur rapport masse/charge était compris en 50 et 1000.

* Gestion des données

Les données ont été manuellement analysées à l'aide du logiciel Qualbrowser Xcalibur version 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). La détection automatique des pics et leur intégration a été réalisée en utilisant le logiciel XCMS de la plateforme Workflow4Metabolomics.

Nous avons obtenu une base de données comprenant pour chaque variable détectée son rapport masse/charge, son temps de rétention et les aires sous la courbe pour chacun des patients (Giacomini et al. 2015). Nous avons ensuite réalisé une sélection des variables avec les filtres suivants : (i) coefficients de corrélation entre les dilutions du mélange contrôle et les aires sous la courbe supérieurs à 0,7, (ii) coefficients de variation des aires sous la courbe inférieurs à 30% et (iii) ratio des aires sous la courbe et des blancs supérieurs à 3.

Les variables sélectionnées ont été annotées à l'aide des bases publiques de métabolomique : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), the Human Metabolome Database (HMDB), and METLIN (Kanehisa and Goto 2000; Smith et al. 2005; Wishart et al. 2007). Les données ont également été annotées à l'aide de la base propre au département « Médicaments et Technologies pour la Santé, MetaboHUB » du CEA de Saclay. Les variables qui ont pu être annotées ont été qualifiées de « métabolites putatifs ».

Des analyses de fragmentation ont été réalisées pour caractériser de façon certaine les métabolites putatifs. Pour être identifié un « métabolite » devait avoir, conformément aux recommandations du *Working Group Metabolomics Standards Initiative*, au moins deux critères en accord avec le standard de référence parmi les critères suivants : (i) masse exacte (écart toléré de 10 ppm), (ii) profil isotopique conforme, (iii) spectre MS/MS similaire et (iv) temps de rétention similaire (Sumner et al. 2007). Nous pouvons être certain de la nature de la molécule pour les métabolites vérifiés. En revanche, nous ne connaissons pas avec certitude la molécule correspondant aux métabolites putatifs non identifiés : plusieurs molécules peuvent avoir le même rapport masse/charge et le même temps de rétention.

Nous avons parallèlement classé les métabolites putatifs en deux catégories : (i) les métabolites putatifs pour lesquels les différences entre les EME et les contrôles sont explicables de façon certaine par les traitements utilisés pour le contrôle de l'EME ou la prise en charge en réanimation, l'alimentation ou les soins, et (ii) les métabolites putatifs pour lesquels aucune raison spécifique n'a été retrouvée pour expliquer les différences. En cas d'hétérogénéité de source (endogène ou exogène) parmi les différents métabolites putatifs ayant le même rapport masse/charge et le même temps de rétention, nous avons conservé le métabolite.

Les analyses suivantes ont été conduites sur le groupe de métabolites putatifs pour lesquels les différences significatives ne pouvaient pas être expliquées par la prise en charge de l'EME.

Nous avons identifié, à l'aide du logiciel MetaboAnalyst (Montréal, QC, Canada), les voies métaboliques perturbées dans l'EME par une méthode d'enrichissement conduite sur les métabolites clairement identifiés. Cette analyse a permis de prendre en compte la nature des métabolites, mais aussi les aires sous la courbe (AUC) pour l'ensemble des patients et en conséquence, le degré de significativité du métabolite.

* **Analyses statistiques**

Des analyses multivariées ont été réalisées pour évaluer la capacité des variables sélectionnées à détecter des différences de groupe. Nous avons tout d'abord réalisé une analyse en composante principale (PCA, *principal component analysis*) qui consiste à transformer des variables liées entre elles en de nouvelles variables décorréelées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont qualifiées de « composantes principales ». Nous avons ensuite réalisé une analyse par régression des moindres carrés partiels (PLS-DA, *partial least squares regression discriminant analysis*). Cette seconde analyse a pour objectif de trouver la meilleure décomposition des données pour prédire la classe des patients (ici, EME ou contrôles). Un modèle de PLS-DA est considéré acceptable si sa prédictibilité (Q²) est supérieure à 0,5 et si la variance expliquée par le modèle (R²Y) est supérieure à la prédictibilité (Q²). Deux cents permutations ont été effectuées afin de vérifier la validité du modèle. Nous avons obtenu une variable pR²Y (pvalue de la variance) qui devait rester inférieure à 0,05 pour conclure à un modèle efficace.

Parallèlement, les AUC des variables sélectionnées ont été comparées entre les patients en EME et les patients contrôles à l'aide du test non-paramétrique de Mann-Whitney. Une correction des pvalues par le test de Benjamini-Hochberg a été effectuée pour corriger le biais induit par les comparaisons multiples. Des différences avec une pvalue inférieure à 0,05 ont été retenues statistiquement significatives.

Nous avons réalisé une heatmap à l'aide du module « heatmaply » du logiciel R studio afin de représenter graphiquement l'intensité, préalablement normalisée, des métabolites putatifs et de distinguer des groupes de patients et de métabolites.

Les données sont représentées par la moyenne ± écart type.

2.3. Résultats préliminaires

Nous avons inclus, pour cette étude, 78 patients en EME (âge moyen $49,9 \pm 19,0$ ans) et 107 patients contrôles (âge moyen $43,2 \pm 17,7$ ans) (pvalue 0,015). Du LCR a été collecté pour 29 patients en EME (âge moyen $54,6 \pm 16,9$ ans) et 29 patients contrôles (âge moyen $52,0 \pm 19,2$ ans) (pvalue 0,66). Aucune différence de sexe n'a été retrouvée entre les deux populations.

Le plasma et le LCR ont été collectés, respectivement $7,50 \pm 15,1$ jours et $12,3 \pm 18,0$ jours après le début de l'EME.

* Analyse multivariée du profil métabolomique

Pour étudier si le profil métabolomique était altéré dans le plasma et le LCR des patients en EME, nous avons réalisé une analyse PCA sur les données obtenues par les colonnes C18 et HILIC. Nous avons mis en évidence une bonne séparation des deux groupes de patients dans le sang (Figure 29A) et dans le LCR (Figure 29B).

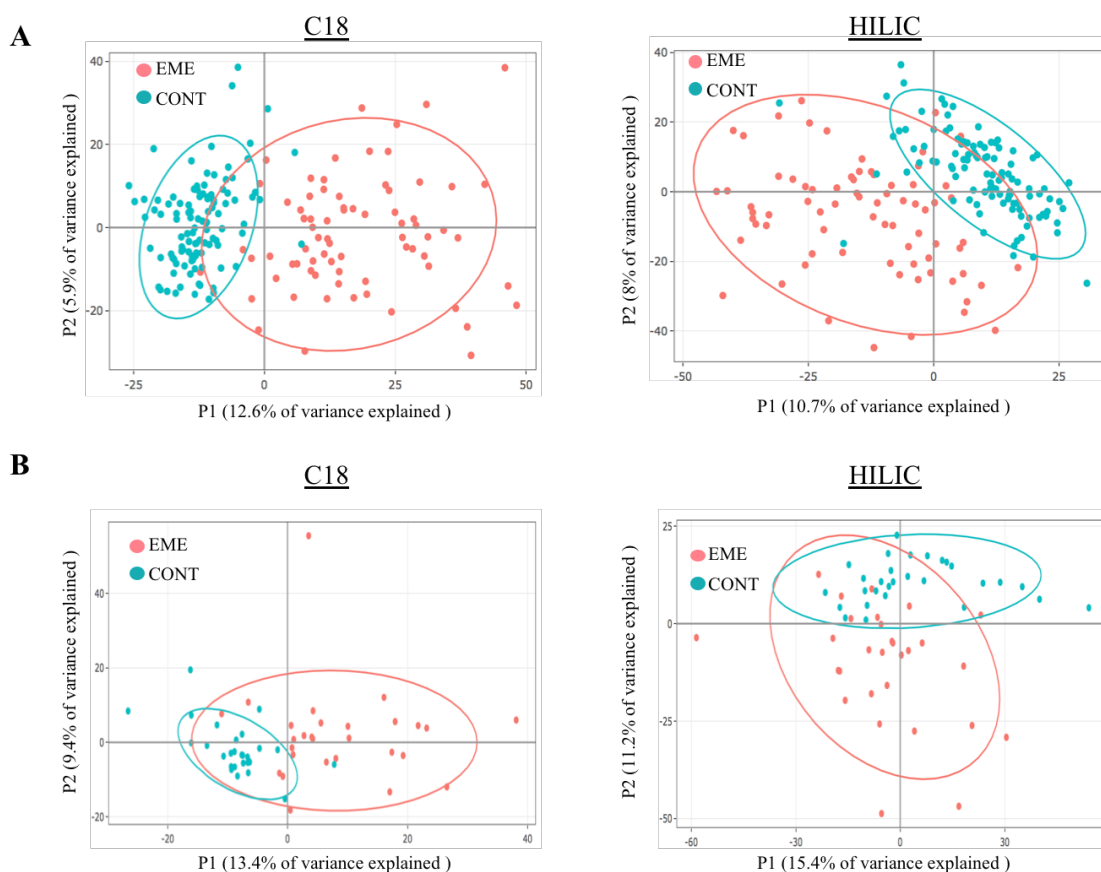


Figure 29 : Analyses PCA.

Les analyses PCA montrent que les variables ne sont pas corrélées dans le sang (A) et le LCR (B) des patients en EME (rose) et des patients contrôles (vert).

De même, les analyses conduites en PLS-DA ont mis en évidence une bonne capacité des variables à séparer les deux groupes de patients, dans le sang (Figure 30A) et dans le LCR (Figure 30B), quelle que soit la colonne utilisée. Nos modèles présentaient une bonne variance expliquée et une bonne prédictibilité : (i) *plasma C18* $R^2Y = 0,948$, $Q^2 = 0,826$; *LCR C18* $R^2Y = 0,877$, $Q^2 = 0,718$; (ii) *plasma HILIC* $R^2Y = 0,959$, $Q^2 = 0,807$ et *LCR HILIC* $R^2Y = 0,986$, $Q^2 = 0,890$. Toutes les pR^2Y étaient inférieures à 0,05.

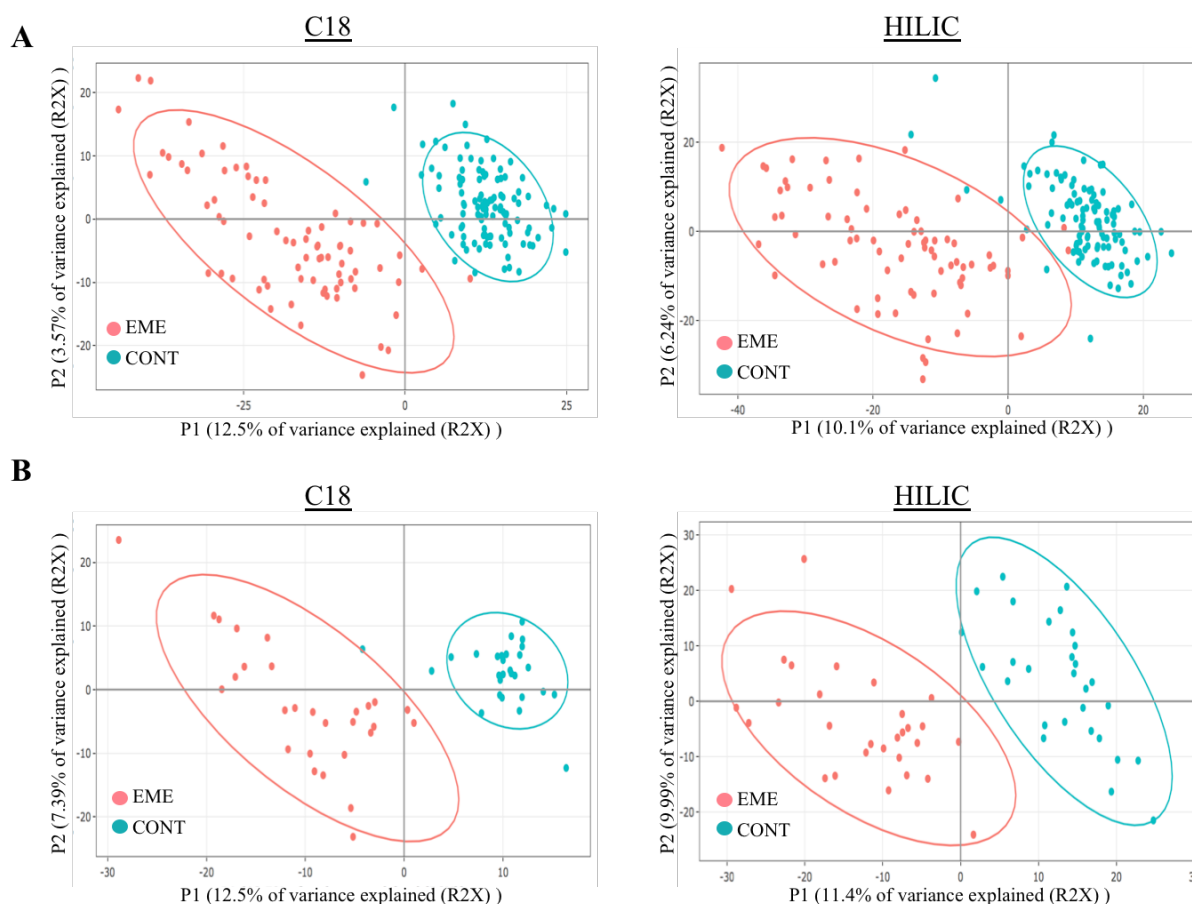


Figure 30 : Analyses PLS-DA.

Les graphiques montrent que les variables du sang (A) et du LCR (B) sont capables de différencier efficacement les patients en EME (rose) et les patients contrôles (vert).

* Étude des métabolites putatifs dans le plasma et le LCR

Nous avons détecté et annoté 1866 métabolites putatifs dans le plasma (C18 : 927 et HILIC : 939) et 1116 métabolites putatifs dans le LCR (C18 : 354 et HILIC : 762).

Une différence significative entre les patients en EME et les patients contrôles a été retrouvée pour 1214 métabolites putatifs dans le plasma (C18 : 643 et HILIC : 571) et 358 métabolites putatifs dans le LCR (C18 : 103 et HILIC : 255).

*** Étude des métabolites putatifs significativement différents entre les EME et les contrôles**

Parmi les métabolites putatifs significativement différents entre les patients en EME et les patients contrôles, nous avons rejeté ceux dont les différences étaient expliquées par un traitement reçu en réanimation ou par l'alimentation. Nous avons alors conservé 188 métabolites putatifs dans le plasma (C18 : 69 et HILIC : 119) et 57 métabolites putatifs dans le LCR (C18 : 18 et HILIC : 39).

Parmi ces métabolites putatifs, certains ont pu être clairement identifiés par comparaison aux standards de référence, ce sont les « métabolites » ; tandis que pour les autres nous n'étions pas certains de la nature du métabolite (plusieurs métabolites putatifs présentaient le même rapport masse/charge et le même temps de rétention).

Nous avons représenté graphiquement les AUC des 57 métabolites putatifs différents dans le LCR afin de chercher des marqueurs évoluant de façon homogène au sein de groupes de patients (Figure 31). Nous avons mis en évidence trois groupes de patients (groupes 1, 2 et 3) et deux groupes majeurs de métabolites (groupes A et B) (Figure 31).

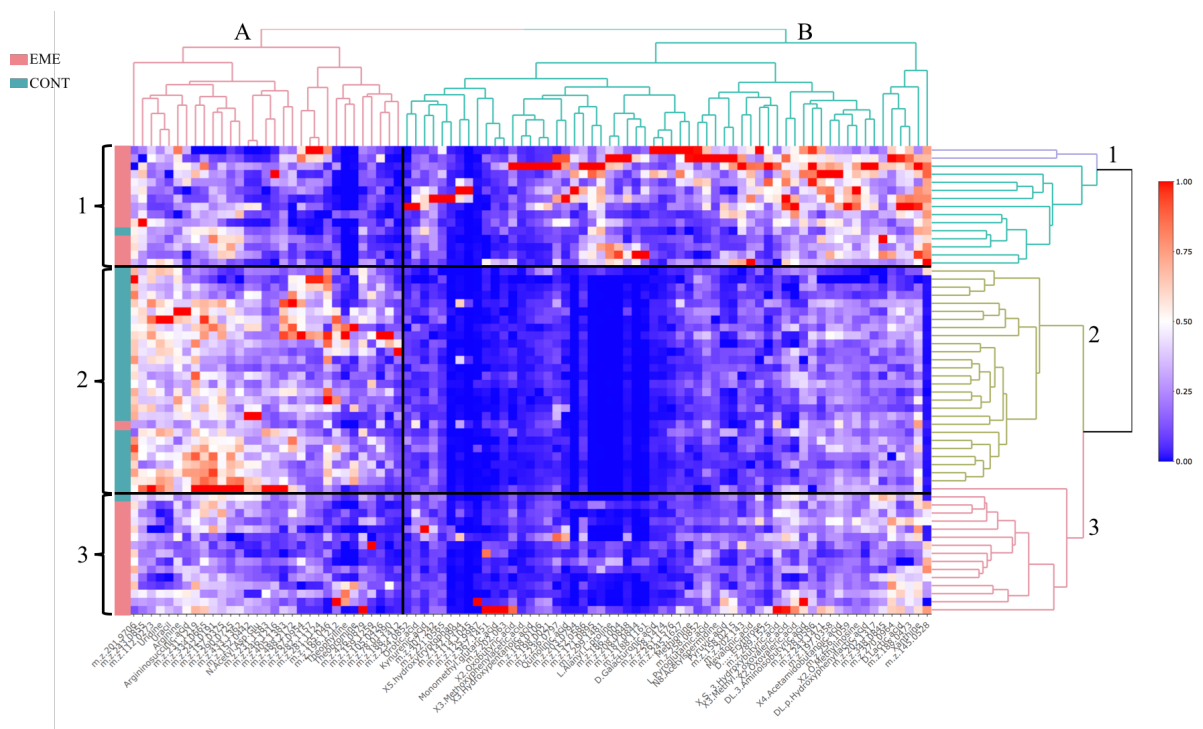


Figure 31 : Heatmap réalisée à partir des aires sous la courbe des 57 marqueurs significativement différents dans le LCR des patients en état de mal épileptique.

La couleur rouge correspond aux aires les plus fortes tandis que la couleur bleue correspond aux aires les plus faibles. Les données ont été préalablement normalisées afin d'avoir la même échelle pour chaque métabolite.

Le groupe 1 était constitué de 15 patients : 14 patients en EME, dont 9 présentaient un EME prolongé super-réfractaire, et 1 patient contrôle qui souffrait d'une épilepsie sévère avec en moyenne 6 crises par jour. Le groupe 2 était constitué de 27 patients contrôles et d'un patient présentant un EME non-réfractaire. Le groupe 3 était constitué de 15 patients : 14 patients en EME, dont 4 présentaient un EME prolongé super-réfractaire, et 1 patient contrôle. Les patients du premier groupe ont eu une ponction lombaire réalisée significativement plus tardivement après le début de l'EME que les patients du troisième groupe ($17,1 \pm 21,3$ jours *versus* $8,29 \pm 13,7$ jours, pvalue 0,030).

Les AUC des métabolites du groupe A étaient significativement plus faibles chez les patients des groupes 1 et 3, qui sont majoritairement des patients en EME. Les AUC des métabolites du groupe B étaient significativement plus élevées chez les patients du groupe 1, qui sont les patients présentant les EME les plus prolongés.

Parmi les métabolites du groupe A, nous avons retrouvé la théophylline et la théobromine, deux marqueurs du métabolisme de la caféine, mais aussi l'uridine et l'uracil deux marqueurs du métabolisme des pyrimidines. Parmi les métabolites du groupe B, nous avons retrouvé l'acide mévalonique, précurseur clé de la voie HMG-CoA-réductase, mais aussi le 5-hydroxytryptophane et l'acide quinolinique, appartenant au métabolisme du tryptophane.

*** Recherche des voies métaboliques significativement impactées par l'EME**

Pour mieux comprendre les changements métabolomiques induits par l'EME, nous avons recherché à quelle(s) voies métabolique(s) appartenaient les métabolites significativement augmentés ou diminués. Pour cette analyse, il était nécessaire de travailler sur des métabolites clairement identifiés. Ainsi, nous avons isolé parmi les métabolites putatifs précédemment décrits, ceux qui avaient été vérifiés préalablement par le CEA de Saclay soit, 80 métabolites dans le plasma (C18 : 22 et HILIC : 58) et 31 métabolites dans le LCR (C18 : 9 et HILIC : 22).

Les voies métaboliques altérées sont représentées sur la Figure 32 pour le plasma (A) et le LCR (B).

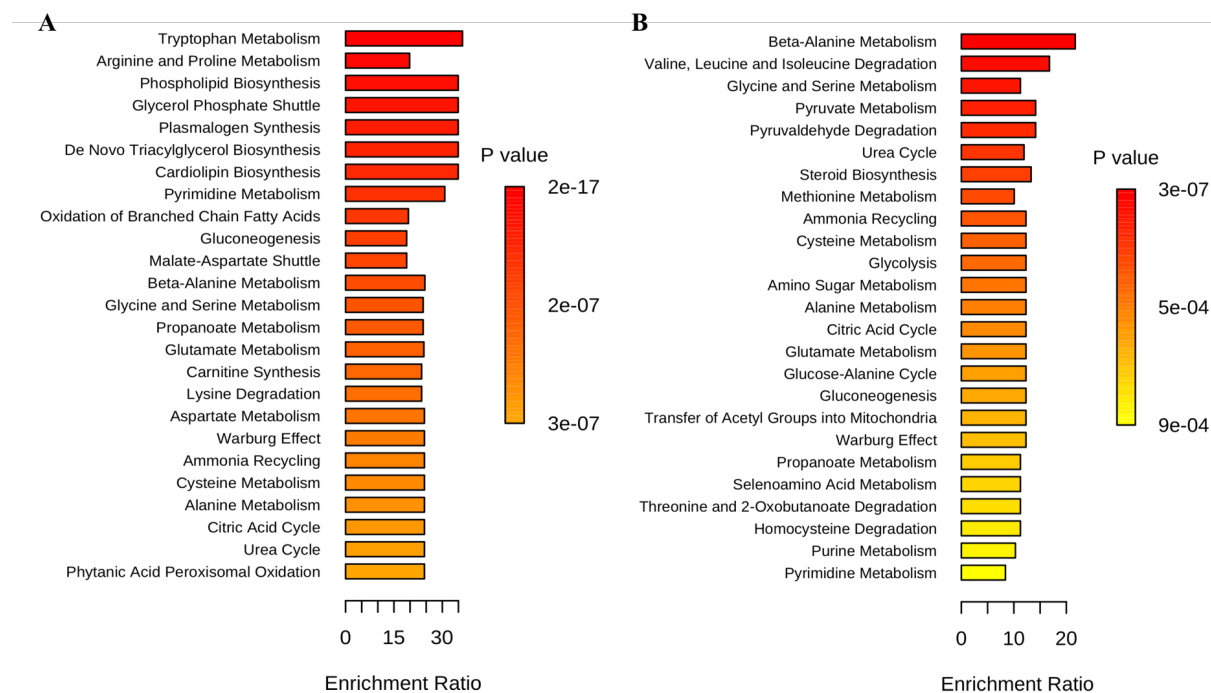


Figure 32 : Présentation des 25 voies les plus perturbées dans le sang et le LCR des patients en état de mal épileptique.

Les résultats détaillés pour les 15 voies les plus impactées sont présentés sur le Tableau 12.

	Total	Hits	Q statistics	Raw p	Holm p	FDR
Blood						
Tryptophan metabolism	60	5	19.70	2.11E-17	1.69E-15	1.69E-15
Arginine and proline metabolism	53	4	10.79	5.35E-10	4.23E-08	6.48E-09
Phospholipid biosynthesis	29	1	18.99	5.67E-10	4.42E-08	6.48E-09
Glycerol phosphate shuttle	11	1	18.99	5.67E-10	4.42E-08	6.48E-09
Plasmalogen synthesis	26	1	18.99	5.67E-10	4.42E-08	6.48E-09
<i>De novo</i> triacylglycerol biosynthesis	9	1	18.99	5.67E-10	4.42E-08	6.48E-09
Cardiolipin biosynthesis	11	1	18.99	5.67E-10	4.42E-08	6.48E-09
Pyrimidine metabolism	59	5	16.73	4.93E-09	3.60E-07	4.93E-08
Oxidation of branched chain fatty acids	26	4	10.60	7.96E-08	5.73E-06	7.07E-07
Gluconeogenesis	35	6	10.30	2.22E-07	1.58E-05	9.58E-07
Malate-Aspartate shuttle	10	2	10.30	2.23E-07	1.58E-05	9.58E-07
Beta-Alanine metabolism	34	2	13.37	2.30E-07	1.58E-05	9.58E-07
Glycine and serine metabolism	59	4	13.08	2.57E-07	1.75E-05	9.58E-07
Propanoate metabolism	42	4	13.08	2.57E-07	1.75E-05	9.58E-07
Glutamate metabolism	49	4	13.20	2.76E-07	1.82E-05	9.58E-07
Cerebrospinal fluid						
Beta-Alanine metabolism	34	1	38.06	2.51E-07	8.29E-06	8.29E-06
Valine, leucine and isoleucine degradation	60	1	29.45	1.08E-05	3.46E-04	1.78E-04
Glycine and serine metabolism	59	4	19.75	3.14E-05	9.74E-04	3.46E-04
Pyruvate metabolism	48	2	24.83	6.87E-05	2.06E-03	4.12E-04
Pyruvaldehyde degradation	10	2	24.83	6.87E-05	2.06E-03	4.12E-04
Urea cycle	29	3	20.95	1.16E-04	3.25E-03	4.12E-04
Steroid biosynthesis	48	1	23.31	1.24E-04	3.35E-03	4.12E-04
Methionine metabolism	43	2	17.67	1.44E-04	3.75E-03	4.12E-04
Ammonia recycling	32	1	21.60	2.37E-04	5.93E-03	4.12E-04
Cysteine metabolism	26	1	21.60	2.37E-04	5.93E-03	4.12E-04
Glycolysis	25	1	21.60	2.37E-04	5.93E-03	4.12E-04
Amino sugar metabolism	33	1	21.60	2.37E-04	5.93E-03	4.12E-04
Alanine metabolism	17	1	21.60	2.37E-04	5.93E-03	4.12E-04
Citric acid cycle	32	1	21.60	2.37E-04	5.93E-03	4.12E-04
Glutamate metabolism	49	1	21.60	2.37E-04	5.93E-03	4.12E-04

Tableau 12 : Résultats détaillés des 15 voies majoritairement impactées par l'état de mal épileptique.

« Total » correspond aux nombres de métabolites dans la voie, « Hits » correspond au nombre de métabolites retrouvés modifiés dans la voie, « Q statistics » décrit la corrélation entre les concentrations des métabolites et le groupe de patients. Le « Q statistics » d'une voie métabolique pour laquelle plus d'un métabolite était perturbé correspond à la moyenne des « Q statistics » de l'ensemble des métabolites. « Raw p » est la pvalue calculée par la méthode d'enrichissement, « Holm p » est la pvalue ajustée par la méthode de Holm-Bonferroni et « FDR » est la pvalue ajustée par le taux de fausses découvertes.

Les modifications métaboliques dans le plasma concernaient majoritairement le métabolisme des acides aminés (tryptophane, arginine, proline, bêta-alanine, glycine, sérine, glutamate), le métabolisme des lipides (phospholipides, glycérol, acides gras, cardiolipine), le métabolisme des pyrimidines, et la néoglucogenèse.

Dans le LCR, les modifications concernaient majoritairement le métabolisme des acides aminés (bêta-alanine, valine, leucine, isoleucine, glycine, sérine, méthionine, cystéine, alanine, glutamate), le métabolisme du pyruvate et du pyruvaldéhyde, le cycle de l'urée et le cycle de Krebs, la synthèse des stéroïdes et la glycolyse.

2.4. Discussion et perspectives

Dans cette étude nous avons analysé, à partir d'échantillons de sang et de LCR, l'impact de l'EME sur les différents métabolismes, par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à de la spectrométrie de masse haute résolution. Nous avons mis en évidence plusieurs dizaines de voies métaboliques modifiées par l'EME. Nos résultats préliminaires ne nous permettent pas encore de caractériser précisément les modifications des différentes voies métaboliques. Toutefois, nous avons pu identifier des premiers métabolites d'intérêt sur-exprimés ou sous-exprimés dans les suites de l'EME.

Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation des AUC du phenylacetyl-L-glutamine, un dérivé de l'acide aminé exciteur glutamine, dans le sang des patients en EME. Le relargage d'acides aminés excitateurs et notamment de glutamine avait été rapporté chez des souris ayant présenté un EME secondaire à une exposition au soman (Fauvelle et al. 2010), ainsi que dans les suites d'un EME induit par une injection intrapéritonéale de lithium chez le rat (Tan et al. 2019).

Nous avons également retrouvé, dans notre cohorte, une augmentation des AUC du lactate dans le LCR des patients en EME. Le lactate est un marqueur de stress oxydant (Folbergrová et al. 2016), qui avait préalablement été montré augmenté dans les suites d'un EME induit par une exposition au soman ou par une injection intrapéritonéale de lithium (Fauvelle et al. 2010; Tan et al. 2019).

En revanche, si une augmentation des concentrations de glycerophosphocholine avait été notée à la suite de l'exposition au soman, nous avons observé une diminution significative des AUC de la phosphatidylcholine (16:0/16:0), une molécule clé pour la synthèse des sphingolipides et impliquée dans la croissance cellulaire et l'apoptose (Kugler et al. 2002).

Par ailleurs, nous avons observé une augmentation des AUC de l'acide mévalonique dans le LCR des patients en EME. L'acide mévalonique est un précurseur clé de la synthèse du cholestérol. L'augmentation des AUC de ce précurseur pourrait refléter la synthèse accrue de cholestérol observée dans les suites d'un EME (Hanin et al. 2021).

Les changements d'expression de divers marqueurs pourraient être en partie expliqués par une activation du facteur de transcription nucléaire c-fos à la suite de l'EME (Le Gal La Salle 1988). En présence d'un stress aigu, le facteur de transcription c-fos s'associe à la protéine c-jun. L'association de ces deux protéines forme le dimère AP-1 qui est capable de se fixer à l'ADN et d'induire l'expression de divers gènes (Sng et al. 2004).

Ces analyses devront être complétées par la recherche en spectrométrie de masse en tandem (MS² ou MS/MS) des autres métabolites des principales voies modifiées. Pour être identifiés, ces nouveaux métabolites devront présenter conjointement une masse exacte, un temps de rétention et un profil MS/MS similaires au standard.

Nous poursuivrons les analyses de MS/MS par l'étude détaillée des différentes voies modifiées. De façon préliminaire, nous avons observé des changements significatifs dans le métabolisme du tryptophane au niveau plasmatique : augmentation de l'hydroxylation du tryptophane en 5-hydroxytryptophane et une diminution de synthèse opposée de l'acide aminobenzoïque et de l'indole 3-acétate. Le 5-hydroxytryptophane, précurseur de synthèse de la sérotonine, a été utilisé pendant plus de 30 ans pour le traitement de la dépression (Shamabadi and Akhondzadeh 2021). Cependant, à des concentrations élevées, cette molécule peut être toxique pour les neurones et les tissus.

Comme les métabolites perturbés dans l'EME peuvent appartenir à différentes voies, il sera nécessaire d'évaluer par une analyse de réseau l'impact relatif des différentes voies. Nous pourrons alors mettre en évidence quelles enzymes sont surexprimées ou sous-exprimées à la suite d'un EME et identifier de possibles stratégies thérapeutiques.

Partie 3. Les statines, une nouvelle stratégie de neuroprotection

1. Étude du potentiel neuroprotecteur et anticonvulsivant des statines dans un modèle murin d'état de mal épileptique

1.1. Introduction

En dépit d'une prise en charge thérapeutique adaptée, près de 25% des EME sont réfractaires aux traitements antiépileptiques (Rossetti and Lowenstein 2011). La surveillance EEG continue optimise la prise en charge des EME réfractaires et limite la mortalité à court terme. Cependant, les décharges épileptiques continues exposent les patients au risque d'excitotoxicité, de mort neuronale prédominant au niveau des structures hippocampiques, et de séquelles neurocognitives irréversibles (Kantanen et al. 2017). Actuellement, il n'existe aucun consensus pour la prévention de ces lésions, et leur origine reste mal comprise.

L'homéostasie lipidique pourrait être impliquée dans la toxicité des EME. L'inhibition de l'enzyme CYP46A1, responsable de la dégradation du cholestérol intracérébral, a entraîné, chez la souris, une accumulation de cholestérol dans les neurones, une mort neuronale progressive et des anomalies épileptiques proches de celles observées dans des modèles murins d'EME et chez l'Homme à la suite d'un EME réfractaire (Chali et al. 2015). De plus, nous avons mis en évidence, chez l'Homme et la souris, une diminution de synthèse du 24-OHc après le début de l'EME, suivie par une synthèse accrue de cholestérol cérébral et périphérique et une altération du bilan lipidique favorisant une accumulation de cholestérol tissulaire (Hanin et al. 2021).

La simvastatine est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique et d'inhiber la synthèse du cholestérol cérébral par une action sur l'enzyme clé, la HMG-CoA-réductase (Sierra et al. 2011). Plusieurs études *in vitro* ont rapporté un effet anti excitotoxique de la simvastatine sur des cultures de neurones exposées au NMDA (Zacco et al. 2003; Ponce et al. 2008). Par ailleurs, l'application de simvastatine sur une culture de cellules granulaires du cervelet a permis de réduire la réponse glutamatergique (Korinek et al. 2015). Une seule étude préclinique a évalué l'effet de la simvastatine administrée dans les suites d'un EME induit par une injection de kaïnate (Xie et al. 2011). Cette étude a rapporté un effet anti-inflammatoire, neuroprotecteur, une diminution de la fréquence des pointes à l'EEG et de la sévérité des crises (Xie et al. 2011). En revanche, l'évaluation de l'efficacité du traitement était tardive (entre quatre et six mois après l'injection). De plus, cette étude n'a pas évalué l'effet du traitement par simvastatine sur l'émergence des crises spontanées observées dans les suites de l'EME.

L'objectif de notre étude était de confirmer l'effet neuroprotecteur de la simvastatine et d'étudier son impact sur l'EME puis sur l'épileptogénèse (émergence des crises spontanées), dans le modèle murin d'EME induit par une injection intrahippocampique de kaïnate.

1.2. Démarche expérimentale

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la Directive 2010/63 de l'Union Européenne et approuvées par le comité d'éthique local (A75-13-19 ; 8302-2017). Les expériences ont été conduites sur des souris mâles C57BL/6J, âgées de 2 mois et pesant entre 20 et 25 grammes (n = 45).

*** Modèle murin d'EME**

Les souris, préalablement analgésiées sous buprénorphine (0,01 mg/kg), ont été anesthésiées dans une cage d'induction avec 4% d'isoflurane pendant 4 minutes, puis maintenues sous anesthésie par 1 à 2% d'isoflurane en masque facial. Le kaïnate (KA, 50 nL ; 20 mM préparé dans une solution de *phosphate-buffered saline*, PBS) ou une solution contrôle de PBS (50 nL) ont été injectés dans l'hippocampe droit (antéro-postérieur -1,8 mm ; médio-latéral -1,8 mm ; dorso-ventral -1,8 mm, par rapport au bregma). Ce site correspond aux dendrites distales des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe (Le Duigou et al. 2008) et a été choisi en accord avec l'atlas cérébral de souris de Paxinos et Watson (Paxinos et al. 1985).

Les souris ont été réparties en trois groupes : (i) souris PBS (n = 5), (ii) souris kaïnate traitées par la simvastatine (KA_Simvastatine) (n = 20) et (iii) souris kaïnate ayant reçu du sérum physiologique (KA_NaCl) (n = 20).

*** Préparation de la simvastatine**

Un comprimé de simvastatine (Zocor 20 mg, MSD) a été broyé chaque jour manuellement. Le broyat a été dilué dans 4 mL d'eau purifiée pour obtenir une solution initiale concentrée à 5 mg/mL. Une solution à 0,125 mg/mL a été obtenue par dilution de 100 µL de la solution initiale dans 3,9 mL de sérum physiologique à 0,9%.

*** Traitement par simvastatine ou NaCl par gavage**

Une administration par gavage de 200 µL de la solution de simvastatine (à 0,125 mg/mL soit environ 1 mg/kg) ou de NaCl a été réalisée 30 minutes après l'injection de kaïnate puis quotidiennement pendant 14 jours.

*** Enregistrement vidéo-EEG**

Après l'injection de kaïnate, 10 souris ont été directement implantées avec (i) deux électrodes bipolaires insérées respectivement dans l'hippocampe droit (antéro-postérieur -1,5 mm ; médio-latéral -1,5 mm ; dorso-ventral -1,8 mm, par rapport au bregma) et l'hippocampe gauche (antéro-postérieur -1,5 mm ; médio-latéral 1,5 mm ; dorso-ventral -1,8 mm, par rapport au bregma), et (ii) une électrode insérée dans le cortex moteur droit (antéro-postérieur 1,8 mm ; médio-latéral -1,8 mm, par rapport au bregma). Une électrode de référence a été placée dans le cervelet de chaque souris.

Les souris implantées ont été placées dans des cages isolées, libres de leur mouvement et reliées à un amplificateur ADC intégré dans un système d'acquisition vidéo-EEG (Deltamed, Natus). Les signaux EEG ont été acquis à une fréquence de 4096 Hz et filtrés entre 0,5 et 70 Hz. Les enregistrements vidéo-EEG ont été réalisés pendant 1 à 5 heures à la suite du premier gavage par simvastatine (n = 5) ou NaCl (n = 5) (jour 1), puis les souris ont été enregistrées de façon continue, 24 heures sur 24, entre le 15^{ème} et le 31^{ème} jour suivant l'injection de kaïnate (Figure 33). Les analyses des signaux EEG ont été effectuées à l'aide du logiciel Deltamed.

*** Préparation des tissus cérébraux murins**

35 souris ont été utilisées pour étudier l'effet neuroprotecteur et anti-inflammatoire d'un traitement par simvastatine : 5 souris ont été injectées par du PBS, 15 souris ont été injectées par du kaïnate et traitées par de la simvastatine et 15 souris ont été injectées par du kaïnate et ont reçu du NaCl.

Les souris ont été euthanasiées 30 jours après l'injection de kaïnate ou de PBS par une injection intrapéritonéale d'une solution de Pentobarbital (150 mg/kg). Une perfusion intracardiaque au Ringer Lactate 1X puis au paraformaldéhyde 4% a été réalisée pour fixer les tissus avant la dissection. Les cerveaux ont été conservés une nuit dans du paraformaldéhyde à 4°C, transférés dans du sucrose à 30% puis congelés dans de l'isopentane et conservés à -20°C jusqu'à l'analyse immunohistochimique.

*** Analyses d'immunofluorescence**

Les cerveaux de souris ont été coupés en tranches de 20 µm au cryostat.

Les tranches ont été lavées dans du PBS puis exposées au tampon citrate et au Triton X-100.

Les anticorps primaires ont été appliqués à 4°C pendant une nuit (neurones NeuN, 1 : 500, MAB377 Merck-Millipore ; astrocytes GFAP, 1 : 250, AB5541, Merck-Millipore et microglie Iba1, 1 : 200, MABN92, Merck-Millipore).

Les anticorps secondaires ont été appliqués pendant 1 heure à température ambiante (Alexa fluor-555-donkey-anti-mouse, 1 : 500, Life Technologies pour NeuN et Iba1 et Alexa fluor-488-goat-anti-chicken, 1 : 500, Life Technologies pour GFAP).

Les images ont été acquises avec le microscope Zeiss et analysées par le logiciel Zen. L'intensité de fluorescence a été quantifiée, d'abord globalement pour chacun des hippocampes, puis spécifiquement pour la région CA1 de l'hippocampe injecté, à l'aide du logiciel ImageJ (NIH).

*** Analyses statistiques**

Les différences de moyenne inter groupes ont été évaluées à l'aide du test de Mann-Whitney et les différences de pourcentage à l'aide du test exact de Fisher.

Des différences avec une pvalue inférieure à 0,05 ont été retenues statistiquement significatives.

1.3. Résultats préliminaires

*** Étude de l'effet de la simvastatine sur la survenue de l'EME**

Les 10 souris ont présenté un EME à la suite de l'injection intrahippocampique de kaïnate. L'EME a été défini par la survenue de crises intermittentes sans retour à un rythme de fond normal à l'EEG entre deux crises successives. La première crise est survenue en moyenne 76,6 minutes après l'injection de kaïnate. Il n'y avait pas de différence dans le délai d'apparition de la première crise chez les souris KA_Simvastatine et les souris KA_NaCl (Tableau 13). Nous avons en revanche noté une diminution du nombre de crises survenant à la suite de l'injection de kaïnate chez les souris traitées par la simvastatine (pvalue 0,035), en dépit d'une période d'enregistrement similaire dans les deux groupes (Tableau 13) (Figure 33A).

EEG réalisé à la suite de l'injection de kaïnate	Délai première crise (Moyenne ± SD, min)	Nombre de crises (Moyenne ± SD)	Durée d'enregistrement (Moyenne ± SD, min)
KA_Simvastatine (n = 5)	74,0 ± 13,3	2,60 ± 1,82	185 ± 104
KA_NaCl (n = 5)	79,2 ± 20,0	11,6 ± 12,1	203 ± 94,6
Pvalue	0,84	0,035	0,69

Tableau 13 : Effet de la simvastatine sur la survenue de l'état de mal épileptique.

*** Étude de l'effet de la simvastatine sur la survenue des crises spontanées**

Seules 6 des 10 souris ont présenté des crises généralisées, séquellaires de l'EME, entre le 15^{ème} et le 31^{ème} jour suivant l'injection de kaïnate : 3 dans le groupe KA_Simvastatine et 3 dans le groupe KA_NaCl.

Contrairement à la phase aiguë initiale de l'EME, le nombre de crises généralisées n'était pas significativement plus élevé chez les souris KA_NaCl (Tableau 14).

Cependant, les crises focales hippocampiques étaient présentes chez plus de souris du groupe KA_NaCl (3/5), que de souris du groupe KA_Simvastatine (1/5) (Tableau 14). Ces crises ont été définies comme des décharges rythmiques épileptiformes de fréquence supérieure à 2,5 Hz et de durée supérieure à 10 secondes, ou par la présence d'un patron de décharge évolutif sur plus de 10 secondes, en accord avec la terminologie de l'ACNS (Figure 33B) (Hirsch et al. 2021).

EEG réalisé entre le 15 ^{ème} et le 31 ^{ème} jour suivant l'injection de kaïnate	Crises généralisées n (%)	Nombre de crises généralisées (Moyenne ± SD)	Crises focales n (%)
KA_Simvastatine (n = 5)	3 (60)	8,20 ± 12,2	1 (20)
KA_NaCl (n = 5)	3 (60)	6,60 ± 8,71	3 (60)
Pvalue	1	1	0,580

Tableau 14 : Effet de la simvastatine sur la survenue des crises spontanées.

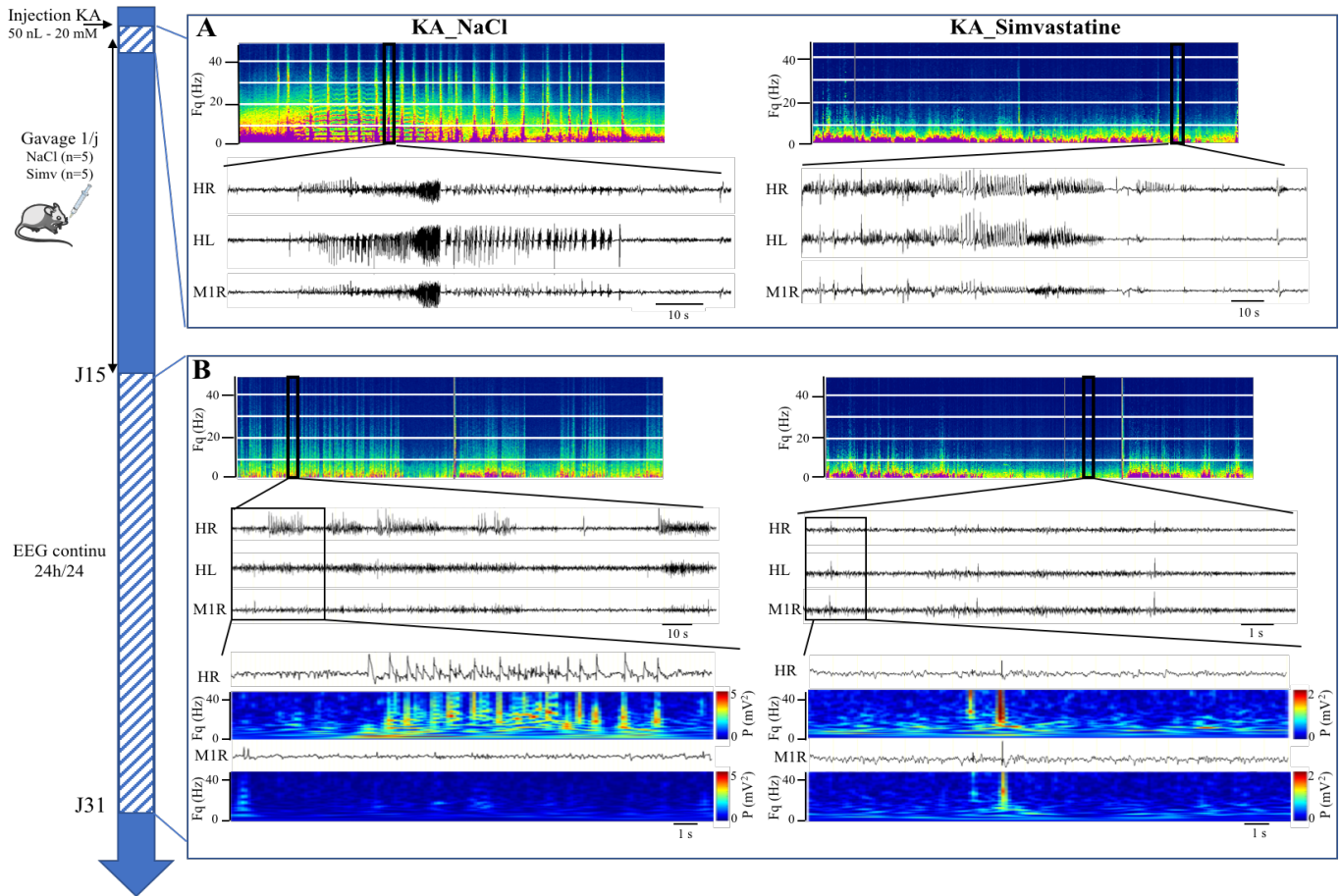


Figure 33 : Effet de la simvastatine sur l'émergence de l'état de mal épileptique et des crises spontanées. **A.** Extraits de l'enregistrement EEG réalisé à la suite de l'injection de kaïnate pour une souris du groupe KA_NaCl (gauche) et une souris du groupe KA_Simvastatine (droite). Une analyse temps-fréquence du signal EEG provenant d'une électrode située dans le foyer, d'une durée de 3 heures, est représentée pour chaque souris. Un zoom de l'activité critique a été effectué. Trois électrodes sont représentées : HR, hippocampe droit injecté ; HL, hippocampe gauche controlatéral et MIR, le cortex moteur droit. **B.** Extraits de l'enregistrement EEG réalisé entre le 15^{ème} et le 31^{ème} jour suivant l'injection de kaïnate pour une souris du groupe KA_NaCl (gauche) et une souris du groupe KA_Simvastatine (droite). Une analyse temps-fréquence du signal EEG provenant d'une électrode située dans le foyer, d'une durée de 3 heures, est représentée pour chaque souris. Un zoom de l'activité EEG à distance des crises généralisées a été effectué. On note la présence d'une crise hippocampique pour la souris KA_NaCl (durée 14 secondes) alors qu'on ne note qu'une pointe isolée pour la souris KA_Simvastatine

*** Étude de l'effet de la simvastatine sur la mort neuronale et la gliose**

Conformément aux données de la littérature, nous avons observé, dans l'hippocampe injecté par la solution de kaïnate, au 30^{ème} jour, une mort neuronale reflétée par une diminution de 40% de l'intensité de fluorescence du marquage neuronal NeuN par rapport aux souris contrôles qui ont reçu une injection de PBS (pvalue 0,011) (Figure 34A-B). Une diminution non significative (pvalue 0,12) de 25% de l'intensité de fluorescence a été notée dans l'hippocampe controlatéral des souris kaïnate (Figure 34B). Les souris traitées par la simvastatine avaient une intensité de fluorescence, mesurée dans l'ensemble de l'hippocampe, similaire aux souris du groupe KA_NaCl (pvalue 0,13) (Figure 34A-B). En revanche, l'étude spécifique de la région CA1 de l'hippocampe injecté (soit l'étude du site d'injection) a montré une intensité de fluorescence significativement plus importante (+42%) pour les souris KA_Simvastatine en comparaison aux souris KA_NaCl (pvalue 0,026) (Figure 34A-C).

Nous avons observé une augmentation de l'intensité de fluorescence du marquage astrocytaire GFAP dans l'hippocampe ipsilatéral (+251%) et dans l'hippocampe controlatéral (+215%) des souris injectées par la solution de kaïnate, en comparaison aux souris injectées par du PBS (respectivement pvalue 0,0025 et pvalue 0,011) (Figure 34A-B). Ce phénomène traduit la présence d'une gliose diffuse dans l'hippocampe et n'a pas pu être prévenu par un traitement par simvastatine. En effet, l'intensité de fluorescence hippocampique pour les souris KA_Simvastatine était similaire à celle des souris KA_NaCl (Figure 34A-B). Cependant, nous avons observé une intensité de fluorescence du marquage astrocytaire 37% plus faible, dans la région CA1 de l'hippocampe injecté, pour les souris traitées par la simvastatine en comparaison aux souris KA_NaCl (pvalue 0,0037) (Figure 34A-C).

Nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation significative de l'intensité de fluorescence hippocampique du marquage microglial Iba1 pour les souris injectées par la solution de kaïnate par rapport aux souris injectées par du PBS (Figure 34 A-B). Cependant, l'étude spécifique de la région CA1 a montré une augmentation de 211% de l'intensité de fluorescence de ce marquage, suggérant une réaction microgliale focale secondaire à l'injection de kaïnate (Figure 34A-C). L'intensité de fluorescence totale hippocampique était 29% plus faible chez les souris traitées par la simvastatine en comparaison aux souris KA_NaCl (pvalue 0,037) (Figure 34A-B). L'administration de simvastatine a entraîné une baisse non significative de l'intensité de fluorescence du marquage Iba1 dans la région CA1 de l'hippocampe injecté.

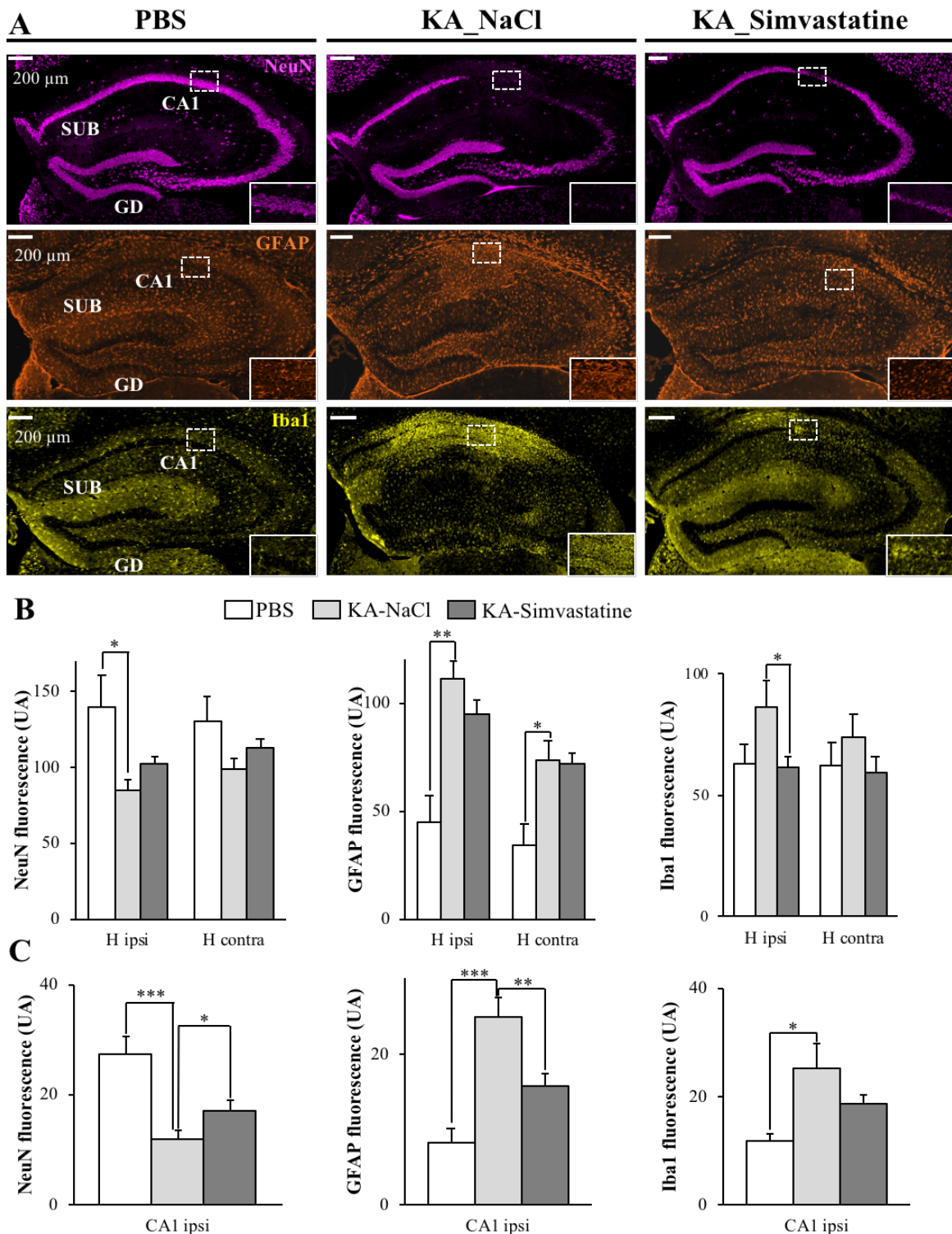


Figure 34 : Effet de la simvastatine sur la mort neuronale et la gliose secondaires à l'état de mal épileptique.

A. Exemples représentatifs de coupes frontales de l'hippocampe injecté chez une souris PBS (gauche), une souris kaïnate traitée par la simvastatine (milieu) et une souris kaïnate ayant reçu du NaCl (droite). Les neurones sont marqués par des anticorps anti-NeuN, les astrocytes par des anticorps anti-GFAP et la microglie par des anticorps anti-Iba1. L'encadré en bas de chaque vignette correspond à un zoom de la région CA1 dont la localisation est indiquée sur chaque image. **B-C.** L'intensité de fluorescence de chaque marquage a été évaluée pour l'hippocampe injecté (H ipsi), l'hippocampe controlatéral (H contra) et la région CA1 de l'hippocampe injecté (CA1 ipsi). Les barres d'erreur correspondent à la SEM.

1.4. Discussion et perspectives

Une diminution du nombre de crises survenant dans les premières heures suivant l'injection de kaïnate a pu être observée chez les souris traitées par la simvastatine. Ce résultat est à interpréter avec prudence de par le faible nombre d'animaux qui ont été enregistrés en vidéo-EEG ($n = 5$ par groupe). De plus, le nombre de crises par souris sur cette première période d'enregistrement était hétérogène dans le groupe KA_NaCl, allant de 4 à 33 crises. Ce résultat est en faveur d'un effet antiépileptique de la simvastatine mais reste à confirmer lors de nouvelles expériences. Les statines sont des molécules pléiotropes qui permettent d'inhiber la synthèse du cholestérol et qui possèdent, en parallèle, un effet anti-inflammatoire et anti-oxydant (Banach et al. 2014). L'ajout de simvastatine à des neurones en culture a permis de diminuer le nombre de récepteurs NMDA dans les radeaux lipidiques et en conséquence les courants médiés par ces récepteurs (Zacco et al. 2003; Ponce et al. 2008). L'ajout de simvastatine a également permis de réduire la fréquence d'ouverture du canal associé aux récepteurs NMDA dans des cultures de cellules granulaires du cervelet (Korinek et al. 2015). La diminution précoce du nombre de crises survenant après l'injection de kaïnate, si elle se confirmait, serait probablement liée à une action de la simvastatine sur la conductance neuronale, plutôt qu'induite par une baisse de la synthèse du cholestérol.

Nous avons observé, lors de la seconde période d'enregistrement, l'émergence de crises généralisées chez 60% des animaux ($n = 6/10$), sans distinction de fréquence entre les groupes. En revanche, nous avons noté une proportion plus faible de souris du groupe KA_Simvastatine présentant des crises hippocampiques (1/5 contre 3/5). La différence n'était pas statistiquement significative et doit être confirmée sur un plus grand nombre d'animaux. Nous sommes en train de mettre au point une méthode de détection automatique de ces crises pour pouvoir analyser les EEG sur de longues périodes et quantifier le nombre et la durée des crises.

Nous avons observé une intensité de fluorescence du marquage NeuN plus importante dans la région CA1 de l'hippocampe injecté dans le groupe KA_Simvastatine, en comparaison au groupe KA_NaCl. Ce résultat suggère que les souris ayant reçu du NaCl ont développé, à la suite de l'injection de kaïnate, une mort neuronale plus importante que les souris traitées par la simvastatine. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature rapportant un effet neuroprotecteur de la simvastatine après l'injection de kaïnate (Xie et al. 2011).

Nous avons également mis en évidence une diminution de la gliose chez les animaux traités par la simvastatine. Nous notons une intensité de fluorescence du marquage GFAP plus faible dans la région CA1 de l'hippocampe injecté chez les souris KA_Simvastatine par rapport aux souris KA_NaCl.

La diminution de la mort neuronale et de la gliose chez les souris traitées par la simvastatine a été mise en évidence spécifiquement dans la région CA1 de l'hippocampe injecté. En effet, nous n'avons pas mis en évidence de différence d'intensité de fluorescence des marquages NeuN et GFAP pour les analyses conduites sur l'hippocampe entier. Nous pouvons supposer que la simvastatine n'a pu compenser qu'une partie des lésions induites par l'EME, avec un effet prédominant au point d'injection. L'absence de différence d'intensité de fluorescence du marquage NeuN pourrait également être expliquée par la dispersion du gyrus denté (c'est-à-dire la prolifération des neurones granulaires), observée dans les suites de l'administration de kaïnate, et qui augmente dès lors l'intensité de fluorescence NeuN pour les souris KA_NaCl et KA_Simvastatine (Bouilleret et al. 1999).

Nous avons observé une réaction microgliale plus importante dans la région CA1 pour les souris injectées par le kaïnate en comparaison aux souris injectées par le PBS. En revanche, le traitement par simvastatine n'a pas permis de diminuer significativement l'intensité de fluorescence du marquage microglial Iba1, dans la région CA1 de l'hippocampe injecté. Ceci pourrait être expliqué par la forte hétérogénéité de fluorescence des souris du groupe KA_NaCl ne permettant pas avec 15 animaux par groupe d'avoir une puissance suffisante pour conclure.

Ces résultats préliminaires semblent confirmer l'effet neuroprotecteur et antiépileptique décrit dans la littérature pour la simvastatine. Ils seront à confirmer sur un plus grand nombre d'animaux et ouvrent la voie à plusieurs questions :

- Par quel(s) mécanisme(s) les statines pourraient-elles présenter un effet neuroprotecteur et antiépileptique ?
- Quel serait l'impact d'une diminution de la mort neuronale et de la gliose sur la survenue des séquelles neurocognitives secondaires à l'EME ? (Gröticke et al. 2008)
- Comment expliquer l'effet de la simvastatine sur les crises hippocampiques et son absence d'effet sur les crises généralisées secondaires à l'EME ?

La confirmation de l'effet neuroprotecteur et antiépileptique de la simvastatine pourrait permettre d'envisager un essai thérapeutique chez des patients admis pour un EME réfractaire.

Partie 4. Optimisation de l'évaluation pronostique des états de mal épileptiques par une approche multimodale

1. L'intelligence artificielle pour optimiser la prédiction de la mortalité, de la morbidité et de la récupération après un état de mal épileptique

1.1. Introduction

L'EME est associé à une importante mortalité, rapportée entre 5 et 46% selon les études (Leitinger et al. 2019). La persistance des crises pendant plusieurs heures, jours, voire semaines expose le patient au risque d'excitotoxicité et de mort neuronale, à l'origine de séquelles neurocognitives et motrices dont la récupération à distance de l'EME est incertaine (Kantanen et al. 2017). Quatre questions se posent lors de la prise en charge d'un patient en EME :

- Quel est le risque que le patient perde de son autonomie dans les suites de l'EME ?
- Quel degré de perte d'autonomie peut-on envisager à court et à long terme?
- Quel est le risque que le patient décède dans les suites immédiates de l'EME ?
- Quelles sont ses chances de récupération à distance de l'EME ?

L'identification de biomarqueurs pronostiques de l'EME est difficile de par l'hétérogénéité des présentations cliniques et des étiologies. Cependant, plusieurs biomarqueurs (démographiques, cliniques, électroencéphalographiques, biologiques ou d'imagerie) et quatre échelles composites (STESS, mSTESS, EMSE, END-IT) ont été proposés ces dernières années pour prédire le risque de décès ou de dégradation des capacités fonctionnelles dans les suites d'un EME (Rossetti et al. 2006; Leitinger et al. 2015b; Gao et al. 2016; González-Cuevas et al. 2016; Alkhachroum et al. 2020). Si les scores STESS et mSTESS sont applicables à tout patient en EME, ils ne permettent pas de suivre l'évolution d'un patient au cours du temps car ils reposent uniquement sur des données obtenues avant l'instauration d'un traitement. L'algorithme EMSE n'est applicable que pour certaines étiologies d'EME et le score END-IT nécessite la réalisation d'une IRM. Ainsi, aucun de ces outils ne peut être utilisé, en routine, pour prédire efficacement le pronostic de tout patient en EME.

Dans ce travail, nous avons évalué l'intérêt de scores mixtes clinico-biologiques, obtenus par des modèles statistiques d'intelligence artificielle pour optimiser l'évaluation pronostique des patients présentant un EME, en termes de perte d'autonomie, de mortalité, et de capacités de récupération.

1.2. Démarche expérimentale

Cette étude a été conduite sur une cohorte de patients admis en réanimation pour un EME à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, entre février 2013 et juin 2020. Nous avons évalué l'intérêt pronostique de 67 variables démographiques, cliniques et biologiques, mesurées à l'entrée du patient en réanimation.

Le pronostic des patients a été évalué à l'aide de l'échelle modifiée de Rankin, à trois temps : avant l'EME, à la sortie de réanimation et entre 6 et 12 mois après la sortie d'hospitalisation.

Nous avons développé des scores mixtes par deux approches d'intelligence artificielle : machine à support de vecteurs, SVM et régression logistique. Nos scores avaient pour objectifs de prédire (i) le risque de mauvais pronostic en sortie de réanimation (décès ou dégradation des capacités fonctionnelles), (ii) le degré de dégradation, (iii) le risque de décès en réanimation et (iv) les capacités de récupération à distance.

Nous avons comparé la puissance de nos outils aux scores précédents STESS et mSTESS pour prédire le risque de mauvais pronostic et de décès en sortie de réanimation.

1.3. Résultats

Nous avons inclus, pour cette étude, 81 patients : 46 patients ont présenté une mauvaise évolution (décès ou dégradation des capacités fonctionnelles) tandis que 35 n'ont pas présenté de dégradation de leur état à la suite de l'EME. Parmi les 46 premiers patients, 14 sont décédés en réanimation, 14 ont présenté un handicap persistant à 6-12 mois et 18 ont récupéré totalement ou partiellement à distance de l'EME.

La combinaison de 11 variables cliniques et biologiques en SVM a permis de prédire efficacement (AUC de 0,75) le mauvais pronostic en sortie de réanimation pour un patient admis en EME. L'association de ces variables a permis de conclure à juste titre à un mauvais pronostic pour 77% des patients et à l'absence de séquelles cognitives ou motrices pour 76% des patients. Un outil simple a également pu être obtenu à l'aide d'un modèle de régression logistique constitué de 3 variables cliniques et biologiques. Il a permis de prédire efficacement le mauvais pronostic en sortie de réanimation, avec une AUC de 0,78, et de conclure, à juste titre, à un mauvais pronostic pour 80% des patients.

Nous avons proposé, pour la première fois, un modèle capable de prédire le degré de dégradation dans les suites de l'EME. Le degré de dégradation correspond à la différence du score de Rankin à la sortie de réanimation et du score de Rankin avant l'EME.

Le score de risque proposé peut être obtenu par un modèle de régression construit sur 3 variables cliniques et biologiques. Ce score, simple d'utilisation, a prédit efficacement le degré de dégradation dans les suites d'un EME avec un écart moyen de seulement -0,14 points de Rankin par rapport à la différence réelle.

La combinaison de 10 variables biologiques par SVM a permis de prédire efficacement (AUC de 0,73) le risque de décès en réanimation pour un patient présentant un EME. L'association de ces variables a permis de conclure à juste titre au décès pour 41% des patients et à la survie pour 94% des patients.

Pour prédire efficacement les capacités de récupération à distance de l'EME (AUC de 0,86) nous avons proposé un modèle SVM construit avec 12 variables cliniques et biologiques. L'association de ces variables a permis de prédire la récupération à distance de l'EME pour 91% des patients et la présence d'une atteinte persistante pour 83% des patients.

Les résultats des analyses biologiques peuvent être obtenus, pour tous les patients, en quelques jours et auprès de tous les laboratoires de biochimie. De plus, ces analyses sont réalisées sur des échantillons sanguins et peuvent dès lors être répétées au cours de la prise en charge en réanimation pour rechercher une évolution du risque de décès ou de dégradation des capacités fonctionnelles en sortie de réanimation ou un changement des chances de récupération à distance de l'EME.

Les scores de régression logistique peuvent être calculés localement par les équipes cliniques. En revanche, les modèles SVM nécessitent une analyse centralisée. Le recours à des dispositifs mobiles (tablettes, applications, ...) pourrait permettre de faciliter le déploiement et l'utilisation de ces outils dans les services cliniques.

Ce travail a été soumis pour publication dans le journal *Neurology* et une demande de brevet a été déposée par l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (référence 2021-353).

1.4. Article 5 : Machine learning to predict mortality, morbidity and recovery after status epilepticus.

Authors:

Aurélié Hanin, PharmD^{1,2}; Sophie Demeret, MD³; Virginie Lambrecq, MD, PhD^{1,2}; Benjamin Rohaut, MD, PhD^{1,3}; Clémence Marois, MD^{3,4}; Meriem Bouguerra^{1,3}; Alexandre Demoule MD, PhD^{5,6}; Jean-Louis Beaudeau, PharmD, PhD^{7,8}; Randa Bittar, PharmD^{9,10}; Jérôme Alexandre Denis, PharmD, PhD¹¹; Françoise Imbert-Bismut, PharmD⁹; Foudil Lamari, PharmD, PhD⁹; Benoit Rucheton, PharmD, PhD⁹; Dominique Bonnefont-Rousselot, PharmD, PhD^{8,9,12}, Mario Chavez, PhD¹; Vincent Navarro, MD, PhD^{1,2,13}.

¹Sorbonne Université, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm, CNRS, APHP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France

²AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, DMU Neurosciences 6, Epilepsy Unit and Clinical Neurophysiology Department, Paris, France

³AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Neuro-Intensive Care Unit, Paris, France

⁴Groupe de Recherche Clinique en REanimation et Soins intensifs du Patient en Insuffisance Respiratoire aiguE (GRC-RESPIRE), Sorbonne Université

⁵AP-HP, Groupe Hospitalier Universitaire APHP-Sorbonne Université, site Pitié-Salpêtrière, *Service de Médecine Intensive et Réanimation (Département R3S)*

⁶Sorbonne Université, INSERM, UMRS1158 *Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique*, Paris, France

⁷AP-HP, Hôpital Necker-Enfants malades, Department of clinical chemistry

⁸Université de Paris, Faculté de Pharmacie, Paris, France

⁹AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Department of Metabolic Biochemistry, Paris, France

¹⁰Sorbonne Université, UMR_S 1166 ICAN, F-75013, Paris, France

¹¹AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Sorbonne Université, Department of Endocrine and Oncological Biochemistry, Paris, France

¹²Unité des Technologies Chimiques et Biologiques Pour la Santé (UTCBS), INSERM U 1267, UMR 8258 CNRS, Université de Paris, Paris, France

¹³Center of Reference for Rare Epilepsies, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

Corresponding author: Pr. Vincent Navarro

Affiliation: Sorbonne Université, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm, CNRS, APHP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, DMU Neurosciences 6, Epilepsy Unit, Paris, France.

Telephone: (+33) 1 42 16 18 11. Email: vincent.navarro@aphp.fr

Word count for the abstract: 350 (max 350) / Word count for the introduction: 249 (max 250)

Word count for the paper: 4299 (max 4500)

Character count for the title: 98 (max 140) / References: 40 (max 50)

Table: 4 / Figures: 2 (max 7)

Neurology Search terms

[17] prognosis; [295] critical care; [60] All Epilepsy/Seizures; [297] status epilepticus, biomarkers

Funding

This work received support from the French “Investissements d’avenir” program ANR-10-IAIHU-06, from the French “Fondation pour la Recherche Médicale” (FDM20170839111) and from the Fondation Assistance Publique Hôpitaux de Paris (EPIRES – Marie Laure PLV Merchandising).

Disclosures

Vincent Navarro reports personal fees from UCB Pharma, Eisai, GW Pharma and LivaNova, outside the submitted work. Alexandre Demoule reports grants, personal fees and non-financial support from Philips and Lungpacer, personal fees from Baxter, Getinge, Lowenstein and Gilead, personal fees and non-financial support from Fisher & Paykel and Respinor and grants from French Ministry of Health, outside the submitted work. Others authors report no disclosures.

Abstract

Background and objectives

The identification of prognostic biomarkers that would apply to all status epilepticus (SE) patients is challenging due to clinical presentations heterogeneity. Here, we aimed to apply a data driven approach using machine learning (ML) models to identify predictive markers of mortality, functional outcome and recovery.

Methods

We enrolled, in this prospective study, SE patients admitted in the Pitié-Salpêtrière Hospital between February 2013 and June 2020. Patients had a follow-up evaluation at 6-12 months after discharge. Their clinical outcome was assessed using the modified Rankin Scale. The prognosis significance of 67 demographic, clinical and biochemical markers was evaluated. The biochemical markers were chosen according to previous preclinical and clinical studies and evaluated upon admission. ML models, obtained by support vector machine (SVM) and logistic regression models, were trained to predict mortality and functional outcome at discharge, and recovery at long-term. Their performances were compared to those of previous scales STESS and mSTESS.

Results

Eighty-one patients were enrolled. Forty-six patients had a poor outcome at discharge (i.e. death or worsening of clinical conditions) while 35 patients had a good outcome (i.e. clinical steady state). Among the 46 patients, 14 died during the hospital stay, 14 had persistent disability at 6-12 months and 18 presented with a recovery at 6-12 months. ML models yielded predictions with the following area under the receiver operating characteristic curve (AUC) scores: 0.75 [0.55-0.90] (SVM) and 0.78 [0.67-0.88] (logistic regression) for poor outcome at discharge; 0.73 [0.54-0.91] (SVM) for mortality at discharge; and 0.86 [0.60-1.0] (SVM) for recovery at 6-12 months. Previous scales provided lower prediction for the poor outcome (AUC STESS=0.63; mSTESS= 0.53) and the mortality (AUC STESS=0.56; mSTESS=0.62).

Conclusions

ML models significantly outperformed STESS and mSTESS scales in predicting outcome after SE. Furthermore, ML models allow the recovery prediction at long-term. They can be straightforwardly applied for all hospitalized SE patients. These tools might be used in clinical routine to monitor SE patients, to follow the impact of a new therapeutic, or to define a targeted and sufficiently homogenous population for further clinical trials in order to permit precise estimation of treatment effect.

Abbreviations

AUC = Area Under the receiver operating characteristic Curve; CSF = CerebroSpinal Fluid; FC = Free Cholesterol; ICU = Intensive Care Unit; ML = Machine Learning; mRS = modified Rankin Score; NORSE = New-Onset Refractory Status Epilepticus; NPV = Negative Predictive Value; PPV = Positive Predictive Value; RSE = Refractory Status Epilepticus; S100B = S100-beta protein; SE = Status Epilepticus; SVM = Support Vector Machine

Introduction

Status epilepticus (SE) is a life-threatening prolonged epileptic seizure.^{1,2} The reported SE mortality ranges from 5% to 46%^{2,3}, and survivors frequently show impairment of their functional outcome at discharge, with inconsistent recovery after several months.^{2,4}

The identification of valuable prognostic biomarkers is challenging due to the heterogeneity of SE etiology and clinical presentation. To help clinicians, various markers (demographic, clinical, biochemical, electrophysiological) and four scales (STESS, EMSE, mSTESS, END-IT) have been proposed to predict SE outcome.⁵⁻¹⁰ Except END-IT, these scales mostly assess mortality at discharge. Only STESS and mSTESS, built on pre-hospitalized clinical data, can be applied to all patients, as EMSE is available for specific etiologies and END-IT required MRI. Despite its key role for treatment decisions, functional outcome assessment is, however, poorly studied.

Status epilepticus is associated with molecular changes that may induce brain injury and subsequent neurologic sequelae.¹¹ Protein biomarkers (e.g. Neuron Specific Enolase, S100beta protein, progranulin) have been proposed to assess the brain injury.¹²⁻¹⁸ We have highlighted the role of lipid metabolism in SE excitotoxicity,¹⁹⁻²¹ suggesting their usefulness as SE outcome biomarkers.

Machine learning (ML) models allow the integration of complex and heterogeneous data into personalized medicine systems. Although ML algorithms have been successfully used in the neurocritical care setting,²² they have never been applied to predict SE outcome.

Here, we assessed, in 81 patients, the prognosis value of 67 demographic, clinical or biochemical markers and we applied ML methods to predict mortality, functional outcome at discharge and recovery after 6-12 months.

Methods

Study design, setting and participants

We included 81 consecutive adult patients admitted with SE in Pitié-Salpêtrière Hospital between February 2013 and June 2020. Patients with post-anoxic SE were excluded, as they required significantly different management and had the worst outcomes.

This study received approval from the University Ethic Committee (2012, CPP Paris VI). All patients or relatives were informed and provided their consent. The study design and report are in accordance with the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology reporting guidelines.²³

Variables selection and data extraction

We evaluated the prognosis significance of 67 features which have been selected according to previous studies (see details in Table1),^{5,6,8,13,14,21,24,25}, including: demographic (age), clinical (previous history of epilepsy, SE etiology, SE refractoriness, SE duration [i.e. the SE end was defined as the absence of seizures after the anesthetics withdrawal], consciousness at enrollment) and biochemical markers including routine laboratory blood measures, brain injury biomarkers, routine lipid biomarkers, precursors and metabolites of cholesterol. The clinical data and routine laboratory measures were extracted from medical records.

Biochemical analyses

The biochemical markers were assessed upon admission in intensive care unit (ICU). Neuron Specific Enolase (NSE) and S100beta protein (S100B) assays were performed using immunofluorimetric assays and electrochemiluminometric sandwich immunoassays (Kryptor® and Modular®E170, Roche Diagnostics), respectively. Progranulin measurements were obtained, in duplicated, using the progranulin-human-ELISA kit (Adipogen).

Total cholesterol (TC), triglycerides, HDL-cholesterol were analyzed by enzymatic methods; and apolipoprotein A1 and apolipoprotein B100 by immunoturbidimetric method on Cobas analyzer (Roche). Phospholipids and free cholesterol (FC) were analyzed by colorimetric method on Konelab analyzer (Thermo Fisher Scientific). Esterified cholesterol (EC) was calculated by difference ($EC=TC-FC$). Lipoprotein(a) and apolipoprotein E were measured by immunonephelometric method on BNII analyzer (Siemens).

An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS) with isotopic dilution method was used to measure sterols (cholesterol, lanosterol, dihydrolanosterol, desmosterol, sitosterol, cholestanetriol) and metabolites of cholesterol (24-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol), both in blood and in cerebrospinal fluid (CSF).²¹

Outcome assessment

The global outcome was assessed from medical records, or by in-person or a telephone structured interview at discharge (called *discharge*) and at 6-12 months (called *follow-up*) using the 7-point version of the modified Rankin Scale (mRS), rated from death (6) to symptom-free full recovery (0).²⁶ The same scale was used to assess the functional state before SE (called *baseline*).

If a patient had several follow-up evaluations, we considered the last evaluation as the $mRS_{\text{follow-up}}$. If a patient had a good outcome at discharge ($mRS_{\text{discharge}}=mRS_{\text{baseline}}$) and was not followed at 6-12 months, we considered the $mRS_{\text{discharge}}$ for the follow-up evaluation.

We performed four analyses: (i) prediction of poor outcome at discharge (i.e. mortality or worsening of clinical conditions; $mRS_{\text{discharge}}>mRS_{\text{baseline}}$); (ii) prediction of the degree of worsening at discharge (i.e. $1<mRS_{\text{discharge}}-mRS_{\text{baseline}}<6$); (iii) mortality prediction at discharge (i.e. $mRS_{\text{discharge}}=6$); and (iv) prediction of recovery at 6-12 months (i.e. $mRS_{\text{follow-up}}<mRS_{\text{discharge}}$).

Statistical analyses

Univariate analyses

We first performed univariate logistic regression analyses to identify markers able to predict SE outcome. The Benjamini-Hochberg procedure was used to correct for multiple comparisons. We used the bootstrap method to estimate the standard errors of R^2 ($n=1000$).

Levels of correlation between quantitative variables and the degree of worsening at discharge ($mRS_{\text{discharge}}-mRS_{\text{baseline}}$) were obtained with Spearman analyses. We performed Fisher tests to assess whether the frequency distribution of categorical data differed between groups.

Selection of variables in multivariate analyses

In order to design scores able to predict SE outcome for all patients, we selected only variables that could be routinely available to clinicians. Firstly, we excluded the CSF measures as lumbar puncture is not systematically performed in SE management (13 variables). Then, we excluded measures obtained by UPLC-MS/MS, as this method can be only performed in few hospitals (10 variables). We finally discarded variables with more than 10% of missing data (6 variables), and inter-related variables (9 variables, defined as Spearman's ρ above 0.80). Our multivariate analyses were conducted on 29 variables (23 non-binary and 6 binary variables). Five patients had missing data on some of these 29 variables and were not considered for multivariate ML analysis.

Machine learning methodology

We applied a data driven approach using machine learning (ML) models (support vector machine and logistic regression) to identify markers predictive of SE outcome.

Support Vector Machine (SVM)

The SVM classifiers are known to be robust to overfitting and work well with complex and high-dimensional datasets.²² They used a kernel transformation to project input data in a higher dimensional space: input data that cannot be distinguished in the original space may become separable after transformation (Fig. 1A).²⁷ Although there are some kernels proposed for binary variables, most of SVM classifiers are optimized for non-binary variables. For this reason, here we only evaluated the prognosis value of our 23 non-binary variables. There were two stages in building the prediction model (Fig. 1B): a training phase, in which a binary classifier (poor or good outcome, death or survival, recovery or non-recovery) used 70% of observations to learn the model; and then a testing phase, in which the remaining 30% of data were used to evaluate its prediction performance. A cross-validation procedure was used with 1000 folds. We also controlled classifiers' performance by using a permutation test (n=1000) where class labels are randomly re-assigned.²⁸

We next selected the most relevant variables. The most "non-significant" variables were removed one by one by a pruning procedure (Fig. 1C): (i) The area under the receiver operating curve (AUC) values were obtained by cross-validation, after removal of each variable; (ii) the variable without which the model had the highest AUC was removed; and (iii) the procedure was repeated with the remaining variables. We could thus identify a set of variables that improves the classification after their removal. If the removal procedure further continued, the classification performance decreased.

Logistic and linear regression models

Logistic regression analysis is currently used to assess relationships between one dependent binary variable and one or more continuous or binary variables. It allows us to construct an index (score) that combined the most important markers. In contrast to SVM, logistic regression models are very sensitive to overfitting. For this reason, we retained only one feature per 10 patients. We therefore did not use logistic regression to predict SE mortality and recovery because we had less than 20 patients in both groups.

Here, we also used a linear regression model to identify variables able to predict the degree of worsening at discharge. The validation and reliability of the prediction system were assessed with the Bland-Altman method and the Spearman correlation coefficient.

To identify the most significant variables to assess the poor outcome at discharge, we first split our population into two sets: a training set (70% of observations) and a testing one (the remaining 30% of data) (Fig.1B). We performed a backward stepwise regression procedure with a 1000-fold cross-validation procedure. At each fold, we obtained the most significant variables and we selected the three most frequently found variables (because we had 35 patients in the smallest group). We further used these variables, to build the prediction model (Fig.1B). Again, a cross-validation procedure (70% of observations were used for the training phase and the remaining 30% for testing) was used with 1000 folds.²⁸

Comparison with previous scales

Except the END-IT, the previous scales mostly assessed short-term mortality.⁵⁻⁸ We did not compare our scores to the END-IT because this scale required MRI data for all patients. We compared our prediction performances for poor outcome and mortality to both STESS and mSTESS scales using the better cut-off reported, 3 for STESS score and 4 for mSTESS score, respectively.^{6,10,29} We did not use the EMSE scale, as some of our patients had SE etiologies, such as auto-immune encephalitis, not covered by this algorithm.

Results

Study participants

We included 81 patients with SE (49 men and 32 women, mean age: 50 (\pm 19) years; mean delay of enrollment (or score calculation) after SE onset: 8 (\pm 15) days) (Fig.2). Fifty-six patients (69%) were initially managed at Pitié-Salpêtrière Hospital while 25 patients (31%) were transferred from another hospital due to uncontrolled SE. Fifty-seven patients (70%) presented with a refractory SE (RSE), defined as a failure of at least two appropriately selected and dosed parenteral medications including a benzodiazepine.²⁴ Forty-four patients (54%) presented with a super-refractory SE and 29 (36%) with a prolonged super-refractory SE, defined respectively as a RSE that persists for at least 24 hours and 7 days, including ongoing need for anesthetics.²⁵ The SE etiologies were categorized into four subgroups: acute (29 patients, 36%), remote (24 patients, 30%), progressive (19 patients, 23%), and SE of unknown etiology (9 patients, 11%).¹ Thirty-eight patients (47%) had previously been diagnosed with epilepsy. Thirty-eight patients (47%) had no previous neurological disability ($mRS_{baseline}=0$), while 15 patients (19%) were already dependent before SE ($mRS_{baseline}$ ranging from 3 to 5).

Outcome prediction at discharge

Prediction of poor outcome at discharge

Forty-six patients (57%) had a higher $mRS_{\text{discharge}}$ score (i.e. poor outcome), when compared with their mRS_{baseline} score (Fig.2). Forty of the 57 patients with RSE (70%) presented with poor outcome after SE compared to only 6 of the 24 patients with a non-refractory SE (25%; $p=0.049$). Patients who had previously been diagnosed with epilepsy had a lower risk to present poor outcome (15 of the 38 patients, 39%) when compared with other patients (31 of the 43 patients, 72%; $p=0.045$).

Among the 67 evaluated biomarkers, five clinical markers were significantly different between the 46 patients with poor outcome and the 35 patients for whom SE had no effect on their functional outcome at discharge (Table2). None of these biomarkers yielded a sufficient R^2 value to be used alone to predict the risk to present poor outcome after SE. Therefore, we assessed their outcome predictive potential by multivariate analyses. The SVM-based predictions using the 23 non-binary variables retained for multivariate analyses failed in most cases (AUC=0.43 [0.23-0.67]). The prediction performance was, however, improved by using the 11 most relevant markers (AUC=0.75 [0.55-0.90], $p=0.001$) and found better when compared with STESS (cut-off at 3, AUC=0.63) and mSTESS (cut-off at 4, AUC=0.53) (Table3). The combination of the 11 markers allowed to predict the poor outcome for 77% of the cases (positive predictive value, PPV=0.77, $p<0.001$). Logistic regression gave similar results to SVM classifier (AUC=0.78 [0.67-0.88], PPV=0.80, $p<0.001$; Table3) by using 3 variables: “*Refractory SE*”, a binary variable which takes the value of 1 in case of refractory SE or 0 in case of non-refractory SE, “*FC*” the concentration of free cholesterol (g/L) and “*phospholipids*” the concentration of phospholipids (g/L).

Prediction of the degree of worsening at discharge

Forty-six of the 81 patients (57%) had poor outcome after SE. The difference between their mRS_{baseline} and their $mRS_{\text{discharge}}$ scores was of 1 for 13 patients (28%), 2 for 6 patients (13%), 3 for 7 patients (15%), 4 for 7 patients (15%), 5 for 9 patients (20%) and 6 for 4 patients (9%). Among the 67 evaluated biomarkers, 17 clinical and biochemical markers were significantly correlated with the difference “ $mRS_{\text{discharge}}-mRS_{\text{baseline}}$ ” (Table4). By linear regression analysis, we identified the three most relevant variables to assess the degree of disability: the highest serum value of S100beta protein (S100B) (ng/mL), the mRS_{baseline} and the creatinine value ($\mu\text{mol/L}$).

The Bland-Altman analysis reported a 95% agreement between -2.5 to 2.3 with a bias of -0.14 between the real ($mRS_{\text{discharge}} - mRS_{\text{baseline}}$) and the predicted score. Moreover, significant correlation coefficients between both measurements are revealed in all states (Spearman's $\rho=0.724, p<0.001$).

Prediction of mortality at discharge

Fourteen patients died at hospital discharge (mean delay after SE onset, 47 (± 40) days), mostly after the withdrawal of life sustaining therapy (11 patients, 79%) (Fig.2). Twelve of the 57 patients with RSE (21%) died at hospital discharge compared to 2 of the 24 patients (8.3%) with non-refractory SE ($p=0.34$). Nine of the 29 patients with prolonged super-refractory SE (31%) died at hospital discharge compared to only 5 of the 52 patients with non-prolonged super-refractory SE (9.6%) ($p=0.074$). The risk to die was not significantly higher for patients with RSE or prolonged super-refractory SE due to lack of statistical power. Half of the 14 died patients presented with SE of acute etiology and five of them had previously been diagnosed with epilepsy (36%).

Among the 67 evaluated biomarkers, seven biochemical markers were significantly different between the 14 died patients and the 67 surviving patients (Table2). Nevertheless, none of these biomarkers had a sufficient R^2 value to be used alone to predict the risk of death after SE. Therefore, we assessed their outcome predictive potential by multivariate analyses. The SVM-based predictions using the 23 non-binary variables retained for multivariate analyses failed in most cases (AUC=0.37 [0.16-0.70]). However, the prediction performance was improved using the 10 most relevant markers (AUC=0.73 [0.54-0.91], $p=0.001$), which was clearly better than those obtained with STESS (cut-off at 3, AUC=0.56) and mSTESS (cut-off at 4, AUC=0.62) (Table3). The combination of the 10 most discriminant variables allowed to predict the death after SE in over 40% of cases (PPV=0.41, $p=0.018$). As the number of observations was unequal in our two groups, we also computed the F1 score, which is a more appropriate metrics for imbalanced scenarios, and defined as the harmonic mean of precision (PPV) and recall (sensitivity).³⁰ For the 10 most relevant markers, the F1 score was of 0.53 [0.32-0.89]; a higher value than those of STESS (0.29) and mSTESS (0.36) scales.

Outcome prediction at long-term

Prediction of recovery at long-term

All 32 surviving patients with poor outcome after SE underwent a follow-up neurological evaluation at 6-12 months. Eighteen patients (56%) showed partial or total recovery of neurologic symptoms (Fig.2).

None of the 67 evaluated biomarkers was significantly different between the 18 patients who recovered and the remaining 14 patients. Nevertheless, we assessed their outcome predictive potential by multivariate analyses. The SVM-based predictions using the 23 non-binary variables retained for multivariate analyses had a moderate ability (AUC=0.57 [0.20-0.90]) to predict the patient evolution. Nevertheless, the prediction performance was improved using the 12 most relevant markers (AUC=0.86 [0.60-1.0], $p<0.001$). SVM models were able to predict the recovery for 91% of the cases (PPV=0.91, $p=0.001$). Moreover, they were able to predict which patients will have persistent disability in 83% of the cases (negative predictive value, NPV=0.83, $p=0.002$).

Discussion

To better manage SE, it is important to have tools that enable to accurately predict both poor and good outcomes, at discharge and at long-term. Four prognosis scales have been proposed in the last fifteen years. Nevertheless, none can be used to follow all SE patients over time: STESS and mSTESS scales can be applied for all SE patients but they are built only on pre-hospitalized data and so cannot be used to follow the evolution of the patient in ICU; EMSE algorithm covered only some SE etiologies; and END-IT scale requires MRI data.⁵⁻⁸ Here, using a cohort of 81 patients and applying ML methods, we found that ML methods can predict patient's outcome for all hospitalized SE patients and at different time points.

Outcome prediction at discharge

In agreement with previous reports, we found a higher risk of poor outcome (i.e. death or worsening of clinical conditions) for patients with RSE, higher SE duration and a lower risk for patients who had previously been diagnosed with epilepsy.^{2,3,5,8,31}

We proposed two clinico-biological tools able to predict the outcome at discharge. Conversely to END-IT which required MRI data,⁷ both these scores can be applied for all SE patients.

The first SVM model retained 11 variables to predict the outcome at discharge. The selected variables can be obtained quickly and reflected non-neurologic organ failure (hepatic dysfunction: total cholesterol, HDL-cholesterol, lipoprotein(a), aspartate aminotransferase; renal dysfunction: urea, creatinine; systemic dysfunction: potassium, chloride),³² the inflammation process induced by SE (S100B, progranulin),¹⁷ and the disease severity highlighted by the SE duration before enrollment.³¹ Our model accurately predicted the outcome (AUC 0.75 [0.55-0.90]). It resulted in a 19% improvement in AUC over the STESS and 42% over the mSTESS. Our model was also accurate to predict which patients will have a good outcome at discharge (NPV=0.76).

The logistic regression model allowed to construct a score that combined the 3 most important markers: a binary variable (RSE) and two continuous variables (free cholesterol, FC and phospholipids levels). Patients with RSE were more likely to have a poor outcome at discharge.³² Similarly, patients with higher FC levels had poor outcome more frequently. We previously found that SE patients had higher FC levels when compared with control or epileptic patients.²¹ The accumulation of FC in neuronal cells was found responsible to neuronal death.¹⁹ This can lead to neurocognitive sequels and may explain why patients with higher FC levels had poorer prognosis. Conversely, patients with higher phospholipids levels presented with a better outcome. Phospholipids composed cellular membranes and are essential for the proper functioning of the membrane-bound proteins.³³ A decrease in phospholipids levels may disturb the properties of cellular membranes and induce a conformational change of the membrane.³⁴ It may affect the activity of the Ca²⁺-ATPase, the Na⁺,K⁺-ATPase or also the sterol-regulatory-element-binding protein that would induce cellular dysfunctions and subsequent sequels.³⁴ Nevertheless, all phospholipids were analyzed simultaneously and this result may hide different trends from the various subtypes of phospholipids. The logistic regression model accurately predicted SE outcome (AUC 0.78 [0.67-0.88]) and resulted in a 24% improvement in AUC over the STESS and 47% over the mSTESS. The results were similar as those obtained with the SVM model to predict the poor outcome but the performances were lower to predict the good outcome (NPV=0.56 vs NPV=0.76). These two ML models (SVM and logistic regression) may allow to easily evaluate the impact of a new neuroprotective or antiepileptic therapeutic on the outcome and the evolution of the patient over time.

To our knowledge, we provided for the first time a clinico-biological score able to predict the degree of worsening induced by SE. Our approach is particularly relevant to better manage SE by providing information to physicians and families.

Our ML model combined three variables: the $mRS_{baseline}$, the S100B and the creatinine levels. Patients with lower $mRS_{baseline}$ are more likely to present with higher degree of worsening at discharge. This result may be explained as 22% of our patients presented with a New-Onset Refractory Status Epilepticus (NORSE), which occurs in patients without preexisting relevant neurologic disorder,²⁵ often young and without other medical history. These patients had the poorer outcome and the longer stay duration in ICU. They are often dependent in the first months after SE due to their cognitive sequels and their inability to walk alone following critical illness neuropathy. The high percentage of NORSE patients in our cohort can be explained as most of our patients were enrolled in a tertiary unit, specialized in the management of super-refractory SE. Increased serum S100B levels were found after an isolated seizure but this biomarker was not previously studied in human SE.¹⁶ The S100B is produced by astrocytes and Schwann cells. At micromolar levels, the S100B have toxic effects by inducing apoptosis and stimulating the expression of pro-inflammatory cytokines.¹⁸ This may explain why higher S100B levels were associated with a higher degree of worsening. Patients with lower creatinine levels presented with a higher degree of worsening. This may reflect the muscular atrophy induced by prolonged ICU stay, with a higher risk of critical illness neuropathy making patients dependent on walking with a $mRS_{discharge}$ above 3.

In contrast to previous studies, we did not find a significantly higher risk of mortality for older patients, patients with an acute SE or with a RSE.^{3,5,8,31} This can be explained by an enrollment bias: most of our patients were enrolled in the neuro ICU of Pitié-Salpêtrière Hospital, a tertiary unit, specialized in the management of super-refractory SE. Super-refractory SE can be induced by acute immune disorders and mostly concern younger patients.^{3,35}

Our SVM model using the 10 most relevant markers was able to predict with a good accuracy the risk of mortality (AUC=0.73 [0.54-0.91]). It resulted in a 30% improvement in AUC over the STESS and 18% over the mSTESS. The 10 variables used by the SVM classifier are routinely available, potentially allowing for easier integration in ICU. They reflected non-neurologic organ failure (hepatic dysfunction: triglycerides, apolipoproteins B and E, free cholesterol, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase; renal dysfunction: urea, creatinine; systemic dysfunction: sodium, potassium), of which a part is known to be associated with the risk of SE and its prognosis.^{36,37} Our model allowed also to predict a positive outcome: the negative predictive value (NPV) of 0.94 ($p=0.002$) means that a negative test is almost an indicator of survival.

Our model seems to show a lower efficiency in predicting mortality when compared with the first publication using EMSE.⁸ EMSE considers the SE etiology, while SVM classifier does not allow to simultaneously integrate binary and continuous variables. Nevertheless, less favorable results were reported thereafter with EMSE.³⁸

Outcome prediction at long-term

We provided for the first-time a tool allowing the prediction of recovery at long-term. It is particularly relevant in the management of SE: a high probability of recovery at long-term may prompt clinicians to continue anesthesia for an extended period of time before deciding to discontinue life sustaining therapies. In addition, it is also relevant to provide accurate long-term prognostication to families. Our SVM model retained the 12 most relevant variables to predict accurately the recovery (AUC 0.86 [0.60-1.0]). The selected variables reflected non-neurologic organ failure (hepatic dysfunction: apolipoprotein B, free cholesterol, gamma GT; renal dysfunction: urea, creatinine; systemic dysfunction: sodium, chloride),³² the brain injury induced by SE (highest serum Neuron Specific Enolase value),¹² and the severity of the disease highlighted by the SE duration.³¹ The age and the mRS_{baseline} are also retained by the algorithm: younger patients without medical history may recover more easily. The last variable was the level of phospholipids. We may hypothesize that higher phospholipids levels may induce lower cellular dysfunctions and that these disturbances may be reversible.

There are three main findings in this study. Firstly, our ML models predict the functional outcome and the mortality at discharge better than the two previous scales, STESS and mSTESS, and our ML models can be applied for all hospitalized SE patients. Secondly, our ML models allow to estimate the degree of worsening induced by SE, which can help to adapt therapeutics. Finally, our ML models can also predict the recovery at long-term when including variables obtained upon admission.

Our study has several limits. It was conducted in a single cohort of patients who were enrolled in a single hospital. Patients presented with various SE etiologies and were enrolled at different time points after SE onset. The prediction of mortality at discharge has to be interpreted with caution as almost 80% of the patients died after the withdrawal of life sustaining therapies. Therefore, the selected variables and the performances of our models might have been different in other centers with other protocols.

In addition, we were not able to distinguish, with the modified Rankin scale, patients with poor outcome related to peripheral neurologic sequels, with great chances of recovery, and central neurologic sequels, potentially irreversible. Therefore, we believe that clinicians will not be able to rely solely on these scores to decide to withdrawal life sustaining therapies. The reproducibility in ML studies is a concern,³⁹ wherein performance measures observed in one cohort may not be generalizable to others, possibly due to overfitting and variations in protocols at different centers. To minimize the model overfitting, we used a 1000-fold cross validation procedure and a 1000-fold permutation test to control the classifier's performance. This study is the first that provides an efficient framework for the prediction of functional outcome, mortality at discharge, and recovery at long-term. Our tools integrate also biochemical data to reflect pathophysiological mechanisms involved in SE excitotoxicity and consequences. Contrary to previous scales, these ML tools can be applied for all hospitalized SE patients, enabling to monitor SE patients over time, to follow the impact of a new therapeutic, or to define a targeted, sufficiently homogenous, population for further clinical trials in order to permit precise estimation of treatment effect. To address the issue of their clinical liability, ML models can be highly operable in mobile devices, which would facilitate their use in routine ICU setting.⁴⁰

Further studies are needed to evaluate the performance of these ML models in patient cohorts from other centers. In the future, the model can be expanded to include imaging or electrographic biomarkers to improve the performances.

Acknowledgments

We thank Marion Houot (Sorbonne Université, Institut du Cerveau – Paris Brain Institute – ICM, Pitié-Salpêtrière Hospital) for her advices for statistical analysis.

References

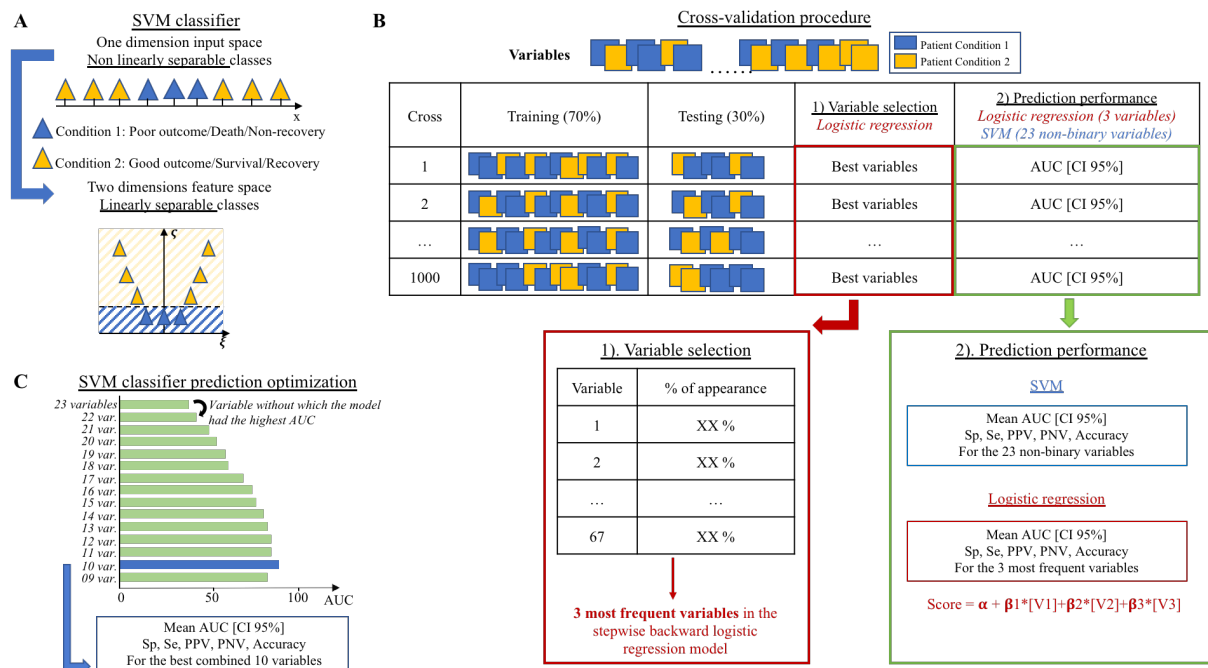
1. Trinka E, Kälviäinen R. 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. *Seizure*. 2017;44:65–73.
2. Leitinger M, Trinka E, Giovannini G, et al. Epidemiology of status epilepticus in adults: A population-based study on incidence, causes, and outcomes. *Epilepsia*. 2019;60:53–62.
3. Alkhachroum A, Der-Nigoghossian CA, Rubinos C, Claassen J. Markers in Status Epilepticus Prognosis. *J Clin Neurophysiol*. 2020;37:422–428.
4. Kantanen A-M, Reinikainen M, Parviainen I, Kälviäinen R. Long-term outcome of refractory status epilepticus in adults: A retrospective population-based study. *Epilepsy Res*. 2017;133:13–21.
5. Rossetti AO, Logroscino G, Bromfield EB. A clinical score for prognosis of status epilepticus in adults. *Neurology*. 2006;66:1736–1738.
6. González-Cuevas M, Santamarina E, Toledo M, et al. A new clinical score for the prognosis of status epilepticus in adults. *Eur J Neurol*. 2016;23:1534–1540.
7. Gao Q, Ou-Yang T, Sun X, et al. Prediction of functional outcome in patients with convulsive status epilepticus: the END-IT score. *Crit Care*. 2016;20:46.
8. Leitinger M, Höller Y, Kalss G, et al. Epidemiology-based mortality score in status epilepticus (EMSE). *Neurocrit Care*. 2015;22:273–282.
9. Yuan F, Gao Q, Jiang W. Prognostic scores in status epilepticus—a critical appraisal. *Epilepsia*. 2018;59 Suppl 2:170–175.
10. Rossetti AO, Logroscino G, Milligan TA, Michaelides C, Ruffieux C, Bromfield EB. Status Epilepticus Severity Score (STESS): a tool to orient early treatment strategy. *J Neurol*. 2008;255:1561–1566.
11. Hanin A, Lambrecq V, Denis JA, et al. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus. *Epilepsia*. 2020;61:6–18.
12. DeGiorgio CM, Gott PS, Rabinowicz AL, Heck CN, Smith TD, Correale JD. Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus. *Epilepsia*. 1996;37:606–609.
13. DeGiorgio CM, Correale JD, Gott PS, et al. Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology*. 1995;45:1134–1137.
14. DeGiorgio CM, Heck CN, Rabinowicz AL, Gott PS, Smith T, Correale J. Serum neuron-specific enolase in the major subtypes of status epilepticus. *Neurology*. 1999;52:746–749.
15. Correale J, Rabinowicz AL, Heck CN, Smith TD, Loskota WJ, DeGiorgio CM. Status epilepticus increases CSF levels of neuron-specific enolase and alters the blood-brain barrier.

Neurology. 1998;50:1388–1391.

16. Freund Y, Bloom B, Bokobza J, et al. Predictive value of S100-B and copeptin for outcomes following seizure: the BISTRO International Cohort Study. *PLoS ONE*. 2015;10:e0122405.
17. Zhu S, Tai C, Petkau TL, et al. Progranulin promotes activation of microglia/macrophage after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Research*. 2013;1530:54–65.
18. Sen J, Belli A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J Neurosci Res*. 2007;85:1373–1380.
19. Chali F, Djelti F, Eugene E, et al. Inhibiting cholesterol degradation induces neuronal sclerosis and epileptic activity in mouse hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2015;41:1345–1355.
20. Chali F, Milior G, Marty S, et al. Lipid markers and related transcripts during excitotoxic neurodegeneration in kainate-treated mice. *Eur J Neurosci*. 2019;50:1759–1778.
21. Hanin A, Baudin P, Demeret S, et al. Disturbances of brain cholesterol metabolism: A new excitotoxic process associated with status epilepticus. *Neurobiol Dis*. 2021;154:105346.
22. Chaudhry F, Hunt RJ, Hariharan P, et al. Machine Learning Applications in the Neuro ICU: A Solution to Big Data Mayhem? *Front Neurol*. 2020;11:554633.
23. Elm E von, Altman DG, Egger M, et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for Reporting Observational Studies. *PLOS Medicine*. Public Library of Science; 2007;4:e296.
24. Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, et al. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*. 2015;56:1515–1523.
25. Hirsch LJ, Gaspard N, van Baalen A, et al. Proposed consensus definitions for new-onset refractory status epilepticus (NORSE), febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES), and related conditions. *Epilepsia*. 2018;59:739–744.
26. Bruno A, Shah N, Lin C, et al. Improving modified Rankin Scale assessment with a simplified questionnaire. *Stroke*. 2010;41:1048–1050.
27. Noble WS. What is a support vector machine? *Nature Biotechnology*. 2006;24.
28. Ojala M, Garriga G. Permutation Tests for Studying Classifier Performance. *J Mach Learn Res*. 2010;11:1833–1863.
29. Giovannini G, Monti G, Tondelli M, et al. Mortality, morbidity and refractoriness prediction in status epilepticus: Comparison of STESS and EMSE scores. *Seizure*. 2017;46:31–37.

30. Saito T, Rehmsmeier M. The precision-recall plot is more informative than the ROC plot when evaluating binary classifiers on imbalanced datasets. *PLoS One*. 2015;10:e0118432.
31. Marawar R, Basha M, Mahulikar A, Desai A, Suchdev K, Shah A. Updates in Refractory Status Epilepticus. *Crit Care Res Pract*. 2018;2018:9768949.
32. Ciurans J, Grau-López L, Jiménez M, Fumanal A, Misis M, Becerra JL. Refractory status epilepticus: Impact of baseline comorbidity and usefulness of STESS and EMSE scoring systems in predicting mortality and functional outcome. *Seizure*. 2018;56:98–103.
33. Adibhatla RM, Hatcher JF. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem*. 2008;49:241–268.
34. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*. 2005;438:612–621.
35. Gaspard N, Hirsch LJ, Sculier C, et al. New-onset refractory status epilepticus (NORSE) and febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES): State of the art and perspectives. *Epilepsia*. 2018;59:745–752.
36. Sonnevile R, Mariotte E, Neuville M, et al. Early-onset status epilepticus in patients with acute encephalitis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:e4092.
37. Gaspard N, Foreman BP, Alvarez V, et al. New-onset refractory status epilepticus: Etiology, clinical features, and outcome. *Neurology*. 2015;85:1604–1613.
38. Pacha MS, Orellana L, Silva E, et al. Role of EMSE and STESS scores in the outcome evaluation of status epilepticus. *Epilepsy Behav*. 2016;64:140–142.
39. Hutson M. Artificial intelligence faces reproducibility crisis. *Science*. 2018;359:725–726.
40. The Lancet Respiratory Medicine. Opening the black box of machine learning. *Lancet Respir Med*. 2018;6:801.

Figure 1: General scheme of the prediction method



A). Nonlinear transformation of non-separable data in the original input space: input data are mapped into a higher dimensional feature space (from 1 to 2-dimensional space in this example) where data become separable. B). Scheme of the cross-validation procedure. The ML classifiers used 70% of the observations to train the model; and then the remaining 30% of data were used to test the prediction performance. A first step of variable selection was performed for logistic regression: the 3 most frequently found variables were retained for the prediction performance. A cross-validation procedure was used with 1000 folds. C). The SVM classifier prediction performances were secondary optimized by selecting the most relevant variables. The “non-significant” variables were removed one by one by a pruning procedure: (i) The area under the receiver operating curve (AUC) values were obtained by cross-validation, after removal of each variable; (ii) the variable without which the model had the highest AUC was removed; and (iii) the procedure was repeated with the remaining variables.

Figure 2: Flow Chart of the study population

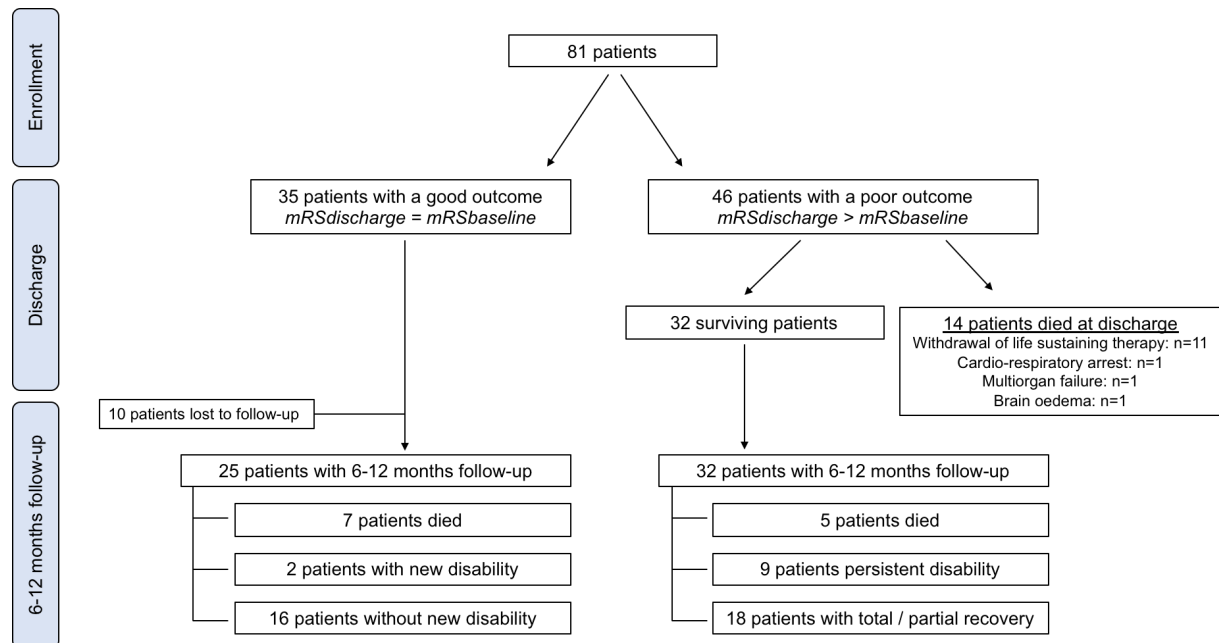


Table 1: Demographic, clinical and biochemical markers

Demographic marker (1)	Age
Clinical markers (12)	
<i>SE subtype (3)</i>	Refractory SE, Super-refractory SE, Prolonged-super-refractory SE
<i>SE etiology (4)</i>	Acute, Remote, Progressive, Unknown
<i>Others clinical markers (5)</i>	Previous history of epilepsy, SE duration, mRS baseline, GCS score at enrollment, FOUR score at enrollment
Biochemical markers (54)	
<i>Routine laboratory blood measures (9)</i>	Sodium, Potassium, Chloride, Urea, Creatinine, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma GT, lactates
<i>Brain injury biomarkers in blood (5)</i>	Neuron Specific Enolase, S100-beta protein, progranulin (if multiple recordings of the measure were available, we recorded the first one and the maximum value)
<i>Brain injury biomarkers in CSF (3)</i>	Neuron Specific Enolase, S100-beta protein, progranulin
<i>Routine blood lipid biomarkers (17)</i>	Total cholesterol (TC), triglycerides, HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C), TC/HDL-C, apolipoprotein A1 (ApoA1), apolipoprotein B (ApoB), ApoA1/HDL-C, ApoB/LDL-C, lipoprotein(a), apolipoprotein E, lipoprotein-associated phospholipase A2, free cholesterol, esterified cholesterol (EC), cholesterol esterification ratio (EC/TC), phospholipids (PL), TC/PL
<i>Routine CSF lipid biomarkers (1)</i>	Apolipoprotein E
<i>Precursors and metabolites of cholesterol in blood (10)</i>	27-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, 24-hydroxycholesterol, cholesterol, sitosterol, dihydrolanosterol, lanosterol, desmosterol, cholestanetriol, 7-ketocholesterol
<i>Precursors and metabolites of cholesterol in CSF (9)</i>	27-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, 24-hydroxycholesterol, cholesterol, sitosterol, dihydrolanosterol, lanosterol, desmosterol, cholestanetriol

Abbreviations: CSF = Cerebrospinal fluid; FOUR score = Full Outline of UnResponsiveness score; GCS = Glasgow Coma Scale; ICU = Intensive Care Unit; mRS = modified Rankin Score; SE = Status Epilepticus

Table 2: Prognosis value of selected markers in predicting poor outcome and mortality at discharge

Markers	Mean values for good outcome patients	Mean values for poor outcome patients	Mean R ²	p-value	Markers	Mean value for surviving patients	Mean value for died patients	Mean R ²	p-value
Age (years)	47	52	0.019	0.49	Age (years)	49	53	0.009	0.81
Total cholesterol (g/L)	1.53	1.59	0.003	0.74	Total cholesterol (g/L)	1.61	1.34	0.047	0.25
Triglycerides (g/L)	1.61	1.80	0.003	0.73	Triglycerides (g/L)	1.67	1.95	0.009	0.81
HDL-cholesterol (g/L)	0.41	0.34	0.035	0.33	HDL-cholesterol (g/L)	0.40	0.25	0.091	0.07
Apolipoprotein B (g/L)	0.79	0.99	0.084	0.13	Apolipoprotein B (g/L)	0.90	0.90	0.001	0.98
Lipoprotein(a) (g/L)	0.28	0.41	0.025	0.38	Lipoprotein(a) (g/L)	0.38	0.21	0.013	0.46
Apolipoprotein E (mg/dL)	5.16	5.67	0.014	0.63	Apolipoprotein E (mg/dL)	5.39	5.73	0.003	0.86
Free cholesterol (g/L)	0.53	0.62	0.039	0.31	Free cholesterol (g/L)	0.57	0.63	0.012	0.76
Esterified cholesterol (g/L)	1.01	0.98	0.000	0.87	Esterified cholesterol (g/L)	1.05	0.71	0.123	0.04
Phospholipids (g/L)	2.13	2.25	0.010	0.62	Phospholipids (g/L)	2.19	2.24	0.002	0.87
NSE highest value (µg/L)	25.8	28.0	0.007	0.70	NSE highest value (µg/L)	25.7	33.8	0.059	0.28
S100B highest value (µg/L)	0.26	0.46	0.038	0.33	S100B highest value (µg/L)	0.27	0.85	0.238	0.01
Progranulin (ng/mL)	120.7	154.4	0.051	0.27	Progranulin (ng/mL)	129.1	191.1	0.124	0.04
AST (UI/L)	409.1	74.8	0.009	0.50	AST (UI/L)	254.7	49.5	-	0.84
ALT (UI/L)	97.0	77.7	0.002	0.83	ALT (UI/L)	95.8	39.6	-	0.76
γGT (UI/L)	198.3	170.6	0.002	0.83	γGT (UI/L)	176.6	211.2	0.008	0.86
Sodium (mmol/L)	139.4	140.2	0.008	0.63	Sodium (mmol/L)	140.2	138.4	0.026	0.46
Potassium (mmol/L)	3.81	3.81	0.001	0.98	Potassium (mmol/L)	3.79	3.91	0.010	0.78
Chloride (mmol/L)	102.9	103.6	0.004	0.73	Chloride (mmol/L)	103.3	103.5	0.003	0.89
Urea (mmol/L)	5.21	5.44	0.010	0.87	Urea (mmol/L)	5.38	5.16	0.001	0.88
Creatinine (µmol/L)	86.1	61.9	0.050	0.30	Creatinine (µmol/L)	77.2	50.6	0.037	0.39
Previous epilepsy (%)	60.5	39.5	0.136	0.04	Previous epilepsy (%)	86.8	13.2	0.011	0.72

SE Acute (%)	24.1	75.9	0.095	0.09	SE Acute (%)	75.9	24.1	0.011	0.53
SE Remote (%)	58.3	41.7	0.046	0.31	SE Remote (%)	91.7	8.33	0.020	0.46
SE Progressive (%)	52.6	47.4	0.012	0.57	SE Progressive (%)	84.2	15.8	0.000	0.88
SE Unknown etiology (%)	44.4	55.6	0.002	0.97	SE Unknown etiology (%)	77.8	22.2	0.006	0.86
SE Duration (days)	2.17	12.5	0.094	0.002	SE Duration (days)	6.91	13.3	0.093	0.15
Refractory SE (%)	29.8	70.2	0.229	0.01	Refractory SE (%)	79.0	21.0	0.021	0.46
mRS baseline	1.34	0.93	0.022	0.42	mRS baseline	1.04	1.43	0.012	0.73
Super-refractory SE (%)*	25.0	75.0	0.212	0.01	Total cholesterol/HDL-C (TC/HDL-C) (AU)*	5.47	11.3	0.150	0.03
Prolonged super-refractory SE (%)*	20.7	79.3	0.138	0.03	Apolipoprotein A1/HDL-C (ApoA1/HDL-C) (AU)*	3.07	4.78	0.171	0.03
					Esterification ratio (EC/TC) (AU)*	0.64	0.52	0.159	0.03
					TC/Phospholipids (AU)*	0.75	0.62	0.124	0.04

The variables in bold represent the variable significantly associated with the risk of poor outcome or mortality at discharge.

*Markers not considered for multivariate analyses.

Abbreviations: ALT = Alanine Aminotransferase; AST = Aspartate Aminotransferase; AU = Arbitrary Unit; ICU = Intensive Care Unit; mRS = modified Rankin Score; NSE = Neuron Specific Enolase; SE = Status Epilepticus

Table 3: Predictive performance of the scores obtained by SVM classifier and logistic regression.

Analysis	Methods	Se	Sp	PPV	NPV	Accuracy	AUC	F1 score ¹
Poor outcome at discharge	SVM classifier (11 variables)²	0.78 [0.58-0.92]	0.75 [0.55-0.91]	0.77 [0.64-0.92]	0.76 [0.58-0.91]	0.76 [0.61-0.87]	0.75 [0.55-0.90]	0.77 [0.61-0.92]
	Logistic regression	0.69 [0.52-0.86]	0.71 [0.45-0.92]	0.80 [0.50-0.95]	0.56 [0.33-0.82]	0.69 [0.55-0.79]	0.78 [0.67-0.88]	0.74 [0.51-0.90]
	STESS (cut-off 3)	0.49	0.77	0.71	0.56	0.62	0.63	0.58
	mSTESS (cut-off 4)	0.29	0.77	0.60	0.48	0.51	0.53	0.39
Death at discharge	SVM classifier (10 variables)³	0.79 [0.50-1.0]	0.71 [0.42-0.95]	0.41 [0.23-0.80]	0.94 [0.88-1.0]	0.72 [0.52-0.91]	0.73 [0.54-0.91]	0.53 [0.32-0.89]
	STESS (cut-off 3)	0.46	0.65	0.21	0.85	0.62	0.56	0.29
	mSTESS (cut-off 4)	0.46	0.78	0.30	0.88	0.72	0.62	0.36
Recovery at 6-12 months	SVM classifier (12 variables)⁴	0.83 [0.60-1.0]	0.87 [0.50-1.0]	0.91 [0.71-1.0]	0.83 [0.60-1.0]	0.85 [0.67-1.0]	0.86 [0.60-1.0]	0.87 [0.65-1.0]

The values are represented as mean [CI 95%].

Abbreviations: AUC = Area Under the receiver operating characteristic Curve; NPV = negative predictive value; PPV = positive predictive value; Se = sensitivity; Sp = specificity; SVM = Support Vector Machine

¹F1 score is calculated as: $2 * Se * PPV / (Se + PPV)$

²The most relevant markers are: total cholesterol, HDL-cholesterol, lipoprotein(a), S100B highest serum value, progranulin, aspartate aminotransferase, potassium, chloride, urea, creatinine, SE duration before enrollment.

³The most relevant markers are: triglycerides, apolipoprotein B, apolipoprotein E, free cholesterol, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, sodium, potassium, urea, creatinine.

⁴The most relevant markers are: age, apolipoprotein B, free cholesterol, phospholipids, NSE highest serum value, gamma GT, sodium, chloride, urea, creatinine, total SE duration and mRS_{baseline}.

Table 4: Estimation of the degree of worsening at discharge

Markers	Spearman's ρ estimate	<i>p</i> -value
Age (years)	-0.068	0.87
Total cholesterol (g/L)	-0.303	0.14
Triglycerides (g/L)	0.377	0.04
HDL-cholesterol (g/L)	-0.482	0.01
Apolipoprotein B (g/L)	0.092	0.78
Lipoprotein(a) (g/L)	-0.162	0.55
Apolipoprotein E (mg/dL)	0.372	0.05
Free cholesterol (g/L)	0.156	0.55
Esterified cholesterol (g/L)	-0.474	0.01
Phospholipids (g/L)	0.074	0.85
NSE highest value (μ g/L)	0.264	0.22
S100B highest value (μg/L)	0.510	0.01
Progranulin (ng/mL)	0.464	0.01
AST (UI/L)	0.273	0.19
ALT (UI/L)	0.214	0.34
γ GT (UI/L)	0.177	0.48
Sodium (mmol/L)	-0.128	0.62
Potassium (mmol/L)	0.097	0.78
Chloride (mmol/L)	-0.004	0.99
Urea (mmol/L)	0.007	0.99
Creatinine (μmol/L)	-0.377	0.05
Previous epilepsy (%)	-0.107	0.03
SE Acute (%)	0.151	0.01
SE Remote (%)	-0.096	0.03
SE Progressive (%)	-0.029	0.62
SE Unknown etiology (%)	-0.026	0.58
SE Duration (days)	0.543	<0.001
Refractory SE (%)	0.012	0.87
mRS baseline	-0.415	0.02
Prolonged super-refractory status epilepticus (%)	0.121	0.02
Apolipoprotein A1 (g/L)*	-0.584	0.02
Esterification ratio (EC/TC) (AU)*	-0.496	0.01
TC/Phospholipids (AU)*	-0.477	0.01
GCS at enrollment*	-0.421	0.02

The correlations between the markers and the difference between mRS_{discharge} and mRS_{baseline} were assessed with Spearman analysis.

The variables in bold were significantly associated with the degree of worsening at discharge.

*Markers not considered for multivariate analyses.

Abbreviations: ALT = Alanine Aminotransferase; AST = Aspartate Aminotransferase; AU = Arbitrary Unit; ICU = Intensive Care Unit; GCS = Glasgow Coma Scale; mRS = modified Rankin Score; NSE = Neuron Specific Enolase; SE = Status Epilepticus.

Contributions

Authors	Roles
Aurélie Hanin	Drafting the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data. Study concept or design. Analysis or interpretation of data. Statistical analysis. Obtaining funding.
Sophie Demeret	Drafting the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data. Analysis or interpretation of data. Study supervision.
Virginie Lambrecq	Revising the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data.
Benjamin Rohaut	Revising the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data.
Clémence Marois	Revising the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data.
Meriem Bouguerra	Revising the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data.
Alexandre Demoule	Revising the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data.
Jean-Louis Beaudeau	Revising the manuscript for content, including medical writing for content.
Randa Bittar	Revising the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data.
Jérôme Alexandre Denis	Revising the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data.
Françoise Imbert-Bismut	Revising the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data.
Foudil Lamari	Revising the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data.
Benoît Rucheton	Revising the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data.
Dominique Bonnefont-Rousselot	Revising the manuscript for content, including medical writing for content. Study supervision.
Mario Chavez	Drafting the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data. Study concept or design. Analysis or interpretation of data. Statistical analysis. Study supervision.
Vincent Navarro	Drafting the manuscript for content, including medical writing for content. Major role in the acquisition of data. Study concept or design. Analysis or interpretation of data. Study supervision. Obtaining funding.

Discussion générale

Au cours de ce travail, nous avons cherché à identifier des biomarqueurs biochimiques permettant de (i) faciliter le diagnostic et le suivi des patients en EME, (ii) proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques en cas d'EME réfractaire et (iii) développer de nouveaux outils clinico-biologiques pour optimiser l'évaluation pronostique des patients et prédire leurs chances de récupération à distance de l'EME.

Notre discussion sera structurée selon ces trois objectifs. Nous discuterons du poids relatif de chacun des marqueurs et associerons à chaque objectif son ou ses marqueurs idéaux.

1. Quelle place pour les biomarqueurs biochimiques dans le diagnostic positif et le suivi des patients en état de mal épileptique ?

Nous avons vu tout au long de ce travail que de nombreux lipides et protéines présentaient des modifications de leur concentration dans les suites d'un EME. Or, si une telle modification est un prérequis indispensable pour l'utilisation d'un marqueur biologique comme biomarqueur diagnostique d'une maladie, cette seule caractéristique ne suffit pas pour valider son utilisation clinique. Un marqueur diagnostique de qualité doit ainsi non seulement varier chez les malades, mais aussi le faire de façon rapide, spécifique et sensible. Nous allons étudier dans cette première partie de discussion les forces et faiblesses de chacun des marqueurs étudiés.

1.1. Un biomarqueur diagnostique idéal ?

Identifier un biomarqueur diagnostique de l'EME revient souvent à identifier un biomarqueur des conséquences de l'EME. En effet, nous ne connaissons pas précisément les mécanismes responsables de la pérennisation d'une crise et de l'émergence d'un EME. En revanche, grâce à l'apport des modèles animaux, plusieurs conséquences physiopathologiques de l'EME ont pu être identifiées et divers marqueurs ont été proposés tels que la NSE pour la mort neuronale ; la progranuline et les cytokines pour la neuroinflammation ; le ratio albumine LCR/sérum pour le changement de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique ou la protéine S100-bêta et la GFAP pour la gliose. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes premièrement intéressés à la NSE, la protéine S100-bêta et la progranuline.

Dans un second temps, nous avons tenté d'identifier de nouveaux biomarqueurs de l'EME en étudiant l'homéostasie du cholestérol, une nouvelle voie physiopathologique possiblement impliquée dans les conséquences de l'EME. Nous avons mis en évidence, à la fois chez l'Homme et dans notre modèle murin d'EME, que l'EME s'accompagnait d'une diminution précoce des concentrations de 24-hydroxycholestérol (24-OHc) et d'une synthèse accrue secondaire de cholestérol comme en témoigne une élévation des concentrations de cholestérol libre dans le sang et dans le LCR (Article 4).

L'utilisation de la progranuline et du 24-OHc comme biomarqueurs diagnostiques de l'EME ne semble pas pertinente de par les délais nécessaires à la mesure de leurs concentrations, respectivement par méthode ELISA et par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que les concentrations plasmatiques de progranuline corrélaient positivement avec la durée de l'EME avant le prélèvement sanguin (Article 1). La progranuline est un marqueur qui reflète l'activation des cellules microgliales. Or, celle-ci n'est observée que plusieurs jours après le début de l'EME. En conséquence, l'absence d'élévation des concentrations de progranuline à l'admission du patient ne permet pas de rejeter le diagnostic d'EME. Nous avons également mis en évidence une élévation des concentrations de cholestérol libre dans le sang et dans le LCR des patients en EME, mais de façon retardée après le début de la maladie (Article 4). Par conséquent, le dosage du cholestérol et de ses précurseurs de synthèse ne semble pas non plus pertinent pour diagnostiquer la survenue d'un EME.

La NSE est le marqueur biochimique qui possède le plus haut niveau de preuve quant à son utilisation comme marqueur diagnostique de l'EME. Étudiée depuis près de trente ans, la NSE est augmentée dans l'ensemble des études conduites dans des modèles animaux d'EME et chez l'Homme (DeGiorgio et al. 1995, 1996, 1999; Rabinowicz et al. 1995; Sankar et al. 1997; Correale et al. 1998). Toutefois, ces études n'ont pas été conduites conformément aux recommandations internationales (population d'étude faible ; parfois il n'y avait pas de groupe contrôle ; pas de présentation des valeurs de sensibilité ou de spécificité ni de report des courbes ROC) (Gnanapavan et al. 2014). Il était donc nécessaire de valider les résultats précédemment obtenus dans une nouvelle cohorte de patients. Sa demi-vie de 24 heures, sa spécificité cérébrale et l'augmentation précoce de ses concentrations à la suite d'un EME, avec un pic dans le sérum après 24 heures, permettent d'envisager l'implémentation de la NSE dans la prise en charge diagnostique de l'EME.

Dans ce travail, nous avons confirmé l'augmentation des concentrations de NSE dans le LCR des patients en EME en comparaison aux patients contrôles non épileptiques (Article 1). En revanche, nous n'avons pas retrouvé d'augmentation significative des concentrations sériques de NSE chez les patients en EME en comparaison aux patients contrôles. Dans notre cohorte, la NSE sérique ne présentait qu'une capacité modérée pour identifier les patients en EME (AUC de 0,624) (Article 1). Des concentrations supérieures à la norme du laboratoire (12,5 ng/mL) ont été observées chez 67% des patients contrôles et 82% des patients en EME. Nous devons souligner la forte hétérogénéité des concentrations dans le groupe contrôle, allant de 8,60 à 48,8 ng/mL. Les concentrations anormalement élevées de NSE dans notre population contrôle doivent être interprétées avec prudence. Les patients retenus comme contrôles ont été admis dans le département de Neurologie pour une évaluation de troubles fonctionnels, de céphalées ou de troubles périphériques et ne constituaient pas ainsi une population contrôle générale. La concentration la plus élevée a été mesurée chez une patiente présentant une hypertension intracrânienne idiopathique. Bien que souvent considérée comme une maladie « bénigne », il est désormais établi que cette pathologie pourrait résulter en des lésions neuronales, possiblement reflétées par une élévation des concentrations de NSE (Samancı et al. 2017).

Nous avons également mis en évidence une augmentation des concentrations sériques de NSE chez les patients en EME, en comparaison aux patients présentant une épilepsie pharmaco-résistante sans EME (Article 1). En revanche, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation des concentrations sériques de NSE chez les patients présentant une épilepsie pharmaco-résistante sans EME en comparaison aux patients contrôles non épileptiques (Article 1). Toutefois, ces patients n'ont pas été prélevés à un temps homogène après leur dernière crise, et ne présentaient pas tous la même fréquence de crises ni le même type sémiologique de crises. Nous avons observé, de façon préliminaire, que la présence de crises pluriquotidiennes était associée à de plus fortes concentrations de NSE au niveau sérique ($18,8 \pm 6,44$ ng/mL) en comparaison aux crises plurihebdomadaires ($13,0 \pm 2,68$ ng/mL) ou mensuelles ($14,3 \pm 6,97$ ng/mL) (données non présentées). Ces résultats préliminaires nous permettent de supposer qu'une crise d'épilepsie isolée ne serait pas à l'origine d'une souffrance cérébrale aiguë. La capacité de la NSE à distinguer la survenue d'une ou plusieurs crises de la survenue d'un EME confère à ce marqueur un réel intérêt diagnostique. Toutefois, la NSE n'est pas un marqueur spécifique de l'EME. Une augmentation des concentrations sériques et dans le LCR de NSE a été relevée dans diverses pathologies telles que le cancer du poumon à petites cellules, l'anoxie cérébrale, l'AVC ischémique, l'hémorragie subarachnoïdienne, l'hémorragie intracérébrale ou le traumatisme crânien (Chou et al. 2014, 2019; Tawk et al. 2016; Helbok and Beer 2017).

Il n'est donc pas possible d'interpréter une concentration de NSE élevée sans prendre en compte l'anamnèse et le contexte clinique. De plus, compte tenu de l'élévation des concentrations quasi-systématique de ce marqueur en cas d'anoxie cérébrale, nous avons décidé de ne pas inclure de patients présentant un EME post-anoxique dans notre étude. Nos résultats ne peuvent pas, en conséquence, être extrapolés à cette population.

La NSE possède une bonne sensibilité pour identifier les patients en EME. Cependant, sa faible spécificité, l'augmentation de ses concentrations chez des patients présentant des troubles neurologiques périphériques, et sa susceptibilité à l'hémolyse, limitent son utilisation en pratique clinique pour le diagnostic de l'EME.

La protéine S100-bêta possédait un niveau de preuve plus faible que la NSE pour le diagnostic de l'EME. Initialement étudiée dans les suites d'une crise d'épilepsie isolée, la protéine S100-bêta était augmentée dans la seule étude qui a été conduite dans un modèle murin d'EME (Palmio et al. 2008; Freund et al. 2015; Vizueté et al. 2017; Meguid et al. 2018). Toutefois, la capacité de ce marqueur à distinguer les crises épileptiques des crises non épileptiques psychogènes et son dosage rapide conféraient à la protéine S100-bêta un intérêt pour le diagnostic de l'EME (Asadollahi and Simani 2019; Parvareshi Hamrah et al. 2020).

Dans notre étude, nous avons mis en évidence, pour la première fois, une augmentation significative des concentrations sériques de la protéine S100-bêta chez les patients en EME, en comparaison aux patients épileptiques sans EME et aux patients contrôles. La protéine S100-bêta possède une bonne capacité diagnostique des patients en EME (AUC de 0,748). Nous avons pu identifier un seuil à 0,09 ng/mL au-delà duquel 84% des patients présentaient un EME. Par ailleurs, plus de 90% des patients sans EME avaient des concentrations de la protéine S100-bêta inférieures à 0,09 ng/mL. En revanche, près de 40% des patients en EME présentaient, à l'admission, des concentrations sériques inférieures à 0,09 ng/mL. Ainsi, une concentration basse de la protéine S100-bêta ne permet pas de conclure à l'absence d'EME.

Nous devons souligner que tout comme la NSE, la protéine S100-bêta est également augmentée dans d'autres atteintes cérébrales aiguës (Sanchez-Peña et al. 2008; Chou et al. 2014; Helbok and Beer 2017). Elle a notamment été validée pour le diagnostic du traumatisme crânien mineur ou modéré (Biberthaler et al. 2006; Zongo et al. 2012). Sur une cohorte de 1309 patients, le diagnostic de traumatisme crânien n'a été retenu, au scanner cérébral, pour aucun patient ayant présenté des concentrations sériques de la protéine S100-bêta inférieures à 0,10 ng/mL (Biberthaler et al. 2006).

Compte tenu de l'élévation des concentrations de la protéine S100-bêta dans d'autres maladies neurologiques, une concentration élevée de la protéine S100-bêta ne pourra pas être interprétée sans tenir compte de l'anamnèse et du contexte clinique.

Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation des concentrations de la protéine S100-bêta dans le LCR des patients en EME en comparaison aux patients contrôles. Ce résultat peut s'expliquer par la demi-vie courte de la protéine S100-bêta (inférieure à 2 heures) et le caractère « tampon » du LCR : de nombreuses molécules s'accumulent dans le LCR, qui, ainsi, reflète davantage les fluctuations moyennes des biomarqueurs sur plusieurs jours plutôt que l'état récent du cerveau. Ce résultat met en lumière que l'identification d'un biomarqueur dosable au niveau sérique est préférable pour le diagnostic des urgences neurologiques comme l'EME.

La protéine S100-bêta dosée au niveau sérique est le biomarqueur biochimique le plus prometteur pour le diagnostic de l'EME. Si des concentrations basses de la protéine S100-bêta ne permettent pas de rejeter le diagnostic d'EME, une concentration élevée en absence d'atteinte cérébrale aigüe comme l'AVC ou le traumatisme crânien peut orienter sur la survenue d'un EME.

1.2. Un biomarqueur de suivi idéal ?

Lorsque le diagnostic d'EME est confirmé et que le patient présente des crises réfractaires aux antiépileptiques, il est nécessaire de recourir à des médicaments d'anesthésie générale pour protéger le cerveau d'une souffrance cérébrale aigüe. Il est crucial de disposer d'outils permettant d'ajuster au mieux la sédation pour prévenir la récurrence des crises et l'apparition de lésions cérébrales et limiter les complications liées à un séjour prolongé en réanimation.

La surveillance EEG continue est un outil clé dans la prise en charge et le suivi des patients en EME réfractaire. Afin de faciliter l'interprétation des données EEG, il est important de disposer d'outils quantitatifs d'évaluation. Dans cette optique, le score 2HELPS2B a été proposé pour quantifier le risque de crise associé à chacun des patrons EEG (Struck et al. 2017). En dépit de sa forte robustesse démontrée dans plusieurs cohortes de taille importante, ce score n'est pas parfaitement adapté pour un suivi longitudinal d'un même patient (Struck et al. 2017, 2020; Moffet et al. 2020).

En effet, le score 2HELPS2B comprend une variable fixe « les antécédents de crise » et ne tient pas compte de la prévalence des anomalies EEG périodiques ou rythmiques, bien qu'un risque de crise accru ait été rapporté en cas de prévalence élevée de telles activités (Rodriguez Ruiz et al. 2017). Ainsi, nous avons proposé un nouvel outil, le score EaSiBUSSEs, construit sur les données de la littérature (Article 2). Ce score repose sur une échelle à 7 niveaux et donne une valeur graduelle du risque de crise selon la morphologie mais aussi la prévalence des différentes anomalies EEG. Ce score, calculé sur trois fichiers de 3 heures, a montré une excellente capacité à identifier les patients qui vont présenter une crise dans les prochaines 24 heures (AUC de 0,903) (Article 2). Ces données ont été obtenues à partir de 103 jours d'évaluation chez 11 patients, et devront donc être confirmées sur une nouvelle cohorte de taille plus importante avant d'envisager le score EaSiBUSSEs comme l'outil de choix pour suivre l'EEG des patients en EME. Il sera également nécessaire d'affiner, à l'avenir, le temps d'enregistrement EEG nécessaire pour faire le calcul du score : un temps d'enregistrement trop court ne nous permettrait pas d'estimer la prévalence des anomalies, tandis qu'un enregistrement trop prolongé réduirait significativement la population de patients qui pourrait bénéficier de cet outil et limiterait son utilisation par les équipes de réanimation. Une durée d'une heure semble un prérequis nécessaire pour estimer la fréquence des anomalies. Il serait également intéressant d'évaluer les capacités du score à prédire la survenue de crises sur un temps plus court, par exemple dans les 3 heures suivant l'analyse.

Bien que l'EEG occupe une place centrale pour le suivi des patients en EME, tous les services de réanimation ne sont pas en mesure d'effectuer un enregistrement EEG continu pendant plusieurs jours ou semaines. Par conséquent, nous nous sommes demandés si des marqueurs biochimiques pourraient refléter l'activité EEG et estimer le risque de recrudescence des crises. Nous nous sommes intéressés à la NSE et à la protéine S100-bêta. Ces deux marqueurs sont capables de refléter les atteintes cellulaires provoquées par la recrudescence des crises ; de plus, leur dosage est rapide et réalisé par des méthodes automatiques rendant possible un suivi quotidien. Nous avons mis en évidence que les concentrations sériques de NSE corrélaient positivement avec les valeurs des deux scores EEG (2HELPS2B et EaSiBUSSEs) : des concentrations basses de NSE étaient associées à des EEG ne présentant pas ou peu d'anomalies épileptiques, tandis que des concentrations élevées de NSE étaient associées à la survenue d'anomalies périodiques fréquentes voire continues ou à la survenue de crises (Article 3).

Nous avons également observé une cinétique d'évolution quotidienne, qui était similaire pour les concentrations sériques de NSE et le score EaSiBUSSEs. La survenue d'une crise isolée (EaSiBUSSEs = 6), à la suite d'un EME, se traduisait par une augmentation des concentrations sériques de NSE. Ce résultat contraste avec l'absence d'augmentation des concentrations sériques de NSE observée chez les patients épileptiques pharmaco-résistants en comparaison aux patients contrôles (Article 1). Toutefois, les patients épileptiques pharmaco-résistants n'avaient pas tous présentés de crise dans les 24 heures précédant le prélèvement sanguin.

Ces variations mettent en avant une question centrale : « *Quel(s) mécanisme(s) est (sont) à l'origine d'une augmentation des concentrations sériques de NSE : une souffrance cérébrale aigüe, un changement de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, ou les deux ?* ».

Nous pouvons envisager les mécanismes suivants :

- Lors d'un EME, l'augmentation des concentrations de NSE traduirait une souffrance cérébrale aigüe et un changement de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Correale et al. 1998).
- Lors d'une crise isolée, il n'y aurait pas de souffrance cérébrale aigüe et en conséquence, le seul changement de perméabilité de la BHE ne s'accompagnerait pas d'une augmentation des concentrations sériques de NSE. L'absence de souffrance cérébrale lors d'une crise isolée pourrait être vérifiée en dosant, dans les suites précoces d'une crise, la NSE dans le LCR. En l'absence de souffrance cérébrale, les concentrations de NSE dans le LCR devraient être similaires à celles de la population témoin.
- Lors d'une crise isolée survenant dans les suites précoces d'un EME, il y aurait un changement de perméabilité de la BHE qui favoriserait le passage de la NSE surexprimée au niveau cérébral, lors de l'EME, du compartiment central au compartiment périphérique. Ce mécanisme pourrait être favorisé par la demi-vie relativement longue de la NSE (près de 24 heures).

Dans cette étude, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation de l'évolution cinétique des concentrations sériques de NSE avec les fluctuations du score EEG 2HELPS2B. Les patients présentaient des scores 2HELPS2B relativement stables d'un jour à l'autre. L'absence de prise en compte de la prévalence des patrons EEG (pointes, anomalies périodiques, décharges rythmiques, crises) limite l'utilisation du score 2HELPS2B pour une évaluation comparative quotidienne.

Contrairement à la NSE, les concentrations sériques de la protéine S100-bêta ne corrélaient pas positivement avec les scores EEG 2HELPS2B et EaSiBUSSEs. L'évaluation des scores a été réalisée sur une période de 9 heures. L'élimination rapide de la protéine S100-bêta par voie rénale (demi-vie d'élimination plasmatique inférieure à 2 heures) pourrait limiter son utilisation pour le suivi quotidien des patients en EME. Par ailleurs, il est important de noter que la protéine S100-bêta présente des concentrations systémiques faibles, classiquement inférieures à 0,10 ng/mL, tandis que les concentrations de la protéine S100-bêta sont mesurées avec une précision au centième. Ainsi, si un patient présentait le jour J une concentration sérique de la protéine S100-bêta de 0,03 ng/mL et une augmentation de 15% le jour suivant, la mesure pourrait encore rendre une concentration de 0,03 ng/mL (au lieu de 0,0345 ng/mL), ce qui limite dès lors la possibilité d'utiliser la protéine S100-bêta pour le suivi fin d'un patient.

Dans un second temps, nous nous sommes demandés si la NSE et la protéine S100-bêta étaient capables de prédire la récurrence des crises dans les 24 heures suivant le dosage. Ces deux marqueurs ne présentent qu'une capacité modérée à identifier les patients qui présentaient une crise dans les 24 heures suivant le dosage (AUC de 0,608 pour la NSE et de 0,592 pour la protéine S100-bêta). Nous avons tout de même pu définir deux seuils d'intérêt pour la NSE : 71% des patients présentant des concentrations de NSE supérieures à 17 ng/mL ont présenté au moins une crise dans les 24 heures suivant le prélèvement, tout comme 80% des patients dont les concentrations de NSE avaient augmenté de plus de 15% entre deux mesures successives. Ce dernier résultat très prometteur utilise une différence de concentration de NSE et ne dépend donc pas des valeurs basales de NSE. Cela permet de s'affranchir du biais lié à l'étiologie de l'EME. En effet, les patients jeunes présentant un EME en lien avec une encéphalite à anticorps anti-récepteurs NMDA ont plus fréquemment des concentrations « basses » de NSE à l'admission, en comparaison aux patients présentant un EME sur des troubles métaboliques ou un syndrome d'encéphalopathie postérieure réversible (Article 3). Cependant, cet outil ne peut actuellement s'appliquer que pour des suivis prolongés, de minimum 3 jours. Il est par ailleurs nécessaire de mesurer l'indice hémolytique pour chaque prélèvement, en raison de la teneur élevée de NSE au sein des hématies et des plaquettes. Les échantillons présentant une concentration en hémoglobine supérieure à 47 mg/dL ne peuvent pas être utilisés pour le dosage de la NSE sérique.

La NSE dosée au niveau sérique semble être un marqueur prometteur pour le suivi des patients en EME. En reflétant les anomalies EEG et en permettant d'estimer le risque de recrudescence des crises, la NSE pourrait être utilisée comme un outil de surveillance des patients admis en réanimation pour un EME réfractaire.

1.3. Comment intégrer les biomarqueurs biochimiques à la prise en charge clinique de l'état de mal épileptique ?

Le biomarqueur idéal pour le diagnostic et le suivi des EME doit pouvoir être mesuré dans le sang des patients, de façon rapide et fiable. Nous avons vu précédemment que la protéine S100-bêta présente un profil intéressant pour le diagnostic de l'EME tandis que la NSE semble prometteuse pour le suivi des patients et l'estimation du risque de recrudescence des crises. Toutefois, il est nécessaire de préciser comment ces biomarqueurs pourraient s'intégrer à la prise en charge clinique de l'EME.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le délai d'instauration du traitement occupe une place centrale pour le contrôle de l'EME (Treiman et al. 1998). Bien que différents industriels travaillent au développement d'un outil d'analyse au lit du patient (ou dans le camion du SAMU), aucun test rapide n'est aujourd'hui disponible pour la protéine S100-bêta. Ainsi, il ne semble pas envisageable d'attendre le résultat du dosage de la protéine S100-bêta avant la mise en place d'un traitement par benzodiazépine, ni même pour l'instauration d'un traitement de deuxième ligne ou d'un médicament d'anesthésie générale en cas de persistance des crises généralisées. En revanche, la protéine S100-bêta pourrait jouer un rôle important pour le diagnostic de l'EME focal ou de l'EME non convulsif, en absence d'EEG réalisé précocement. De plus, comme la protéine S100-bêta n'augmente que très rarement chez les patients épileptiques sans EME, il pourrait être intéressant d'utiliser la protéine S100-bêta comme un marqueur de tri aux urgences pour les patients admis à la suite de crises d'épilepsie : une concentration sérique élevée pourrait inciter les cliniciens à maintenir le patient à l'hôpital pour une observation médicale et à demander la réalisation d'un EEG en urgence ou une hospitalisation.

Alors que la protéine S100-bêta a un intérêt dans le parcours de soin initial d'un patient admis pour un EME, la NSE semble plutôt utile pour le suivi des EME réfractaires et l'estimation du risque de récurrence de crise en réanimation.

Notre étude a mis en évidence que les concentrations sériques de NSE pouvaient refléter la gravité des anomalies électroencéphalographiques. La NSE pourrait en conséquence être utilisée comme un outil de surveillance dans les services de réanimation, à la fois pour ceux qui ne sont pas en mesure d'effectuer des enregistrements EEG 24 heures sur 24 pour l'ensemble de leurs patients, mais aussi pour ceux qui disposent d'une telle surveillance EEG continue, pour les aider dans certaines situations où les anomalies EEG sont tellement complexes qu'il est délicat de conclure ou non à une reprise d'une activité critique. En cas d'élévation des concentrations sériques de NSE, il pourrait être suggéré à l'équipe clinique de demander un EEG de façon quotidienne ou biquotidienne. Une élévation des concentrations sériques de NSE pourrait alerter sur un risque de récurrence de crise. Ainsi, il pourrait être suggéré aux équipes cliniques de maintenir les traitements antiépileptiques et/ou d'anesthésie en cas d'élévation des concentrations de NSE. Cependant, l'interprétation des concentrations sériques de NSE doit s'implémenter aux données d'EEG, d'imagerie et à l'évolution clinique : une élévation isolée des concentrations sériques de NSE ne doit pas inciter les réanimateurs à ajouter un nouveau traitement sédatif. De même, une baisse des concentrations sériques de NSE ne suffit pas pour décider d'une levée des sédatifs ou du retrait d'un traitement antiépileptique.

Il serait intéressant d'étudier l'impact d'une association EEG-NSE pour un suivi optimal du risque de récurrence de crise et d'évaluer le potentiel prédictif de la NSE chez des patients admis en réanimation sans EME, et notamment en cas d'encéphalite auto-immune.

2. Quelle place pour les biomarqueurs biochimiques dans l'identification d'une stratégie de neuroprotection chez les patients en état de mal épileptique réfractaire ?

Même si la protéine S100-bêta et la NSE présentent un profil intéressant respectivement pour le diagnostic positif de l'EME et le suivi des patients en réanimation, aucun de ces biomarqueurs ne permet de proposer une stratégie thérapeutique de neuroprotection pour les patients présentant un EME réfractaire. En revanche, nous avons vu précédemment que l'EME s'accompagnait, chez l'Homme et l'animal, d'une altération de l'homéostasie du cholestérol marquée notamment par une diminution des concentrations plasmatiques et tissulaires en 24-OHc et par une synthèse accrue secondaire de cholestérol (Article 4). L'accumulation de cholestérol dans les neurones est responsable de l'apparition d'une mort neuronale progressive et de la survenue de crises d'épilepsie spontanées (Chali et al. 2015). Actuellement, il n'existe aucun consensus pour la prévention des lésions cérébrales post-EME. Nous avons suggéré qu'un traitement hypocholestérolémiant pourrait être utilisé pour prévenir l'apparition des lésions cérébrales et le développement d'une épilepsie séquellaire dans les suites d'un EME réfractaire. Afin d'abaisser la concentration cérébrale en cholestérol, nous avons choisi d'utiliser la simvastatine, un médicament sûr et efficace dans le traitement pharmacologique de l'hypercholestérolémie et capable de franchir la BHE. Nous discuterons dans cette seconde partie les fondements de ce choix thérapeutique et sa supériorité par rapport aux autres stratégies de modulation du métabolisme du cholestérol.

2.1. Inhibition de la synthèse du cholestérol, quels outils ?

Les statines sont une famille de molécules capables de diminuer la synthèse du cholestérol par une action sur l'enzyme clé HMG-CoA réductase. La lovastatine (Mevacor) est la première statine à avoir été commercialisée, en 1987. Il existe actuellement sept statines sur le marché international. Plusieurs études ont été conduites ces vingt dernières années pour évaluer l'impact neuroprotecteur et anticonvulsivant de statines *in vitro* et dans des modèles animaux d'EME (Zacco et al. 2003; Ponce et al. 2008; Xie et al. 2011; Korinek et al. 2015). Même si des résultats prometteurs avaient été observés, il était nécessaire de confirmer la synthèse accrue de cholestérol, chez l'Homme, dans les suites de l'EME, avant d'envisager l'utilisation de ces traitements en clinique.

Nous avons confirmé, par une approche multimodale et translationnelle, que l'EME s'accompagnait d'une synthèse accrue de cholestérol cérébral et périphérique (Article 4). L'augmentation de la synthèse du cholestérol au niveau cérébral nécessitait d'avoir recours à une statine capable de franchir la BHE et d'inhiber efficacement l'HMG-CoA réductase cérébrale. Une étude comparative des propriétés pharmacologiques de neuf statines a montré que la simvastatine et la lovastatine possédaient les meilleures performances pour franchir la BHE, inhiber l'HMG-CoA réductase et protéger les cellules neuronales de l'action de l'acide okadaïque (Sierra et al. 2011). Seule la simvastatine est commercialisée en France. Ce médicament avait préalablement été montré capable de réduire la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, de diminuer la mort neuronale et la gliose ainsi que la sévérité des crises lorsqu'il était administré à la suite d'un EME chez l'animal (Xie et al. 2011). Nos résultats préliminaires obtenus dans le modèle murin d'EME induit par une injection de kaïnate intrahippocampique semblent confirmer l'effet neuroprotecteur de la simvastatine (résultats partie 3). L'efficacité de la simvastatine a été observée pour une concentration de 1 mg/kg/jour, similaire à celle utilisée pour le traitement de l'hypercholestérolémie chez l'Homme. L'utilisation de la simvastatine pourrait dès lors être envisagée sans risquer de provoquer des effets indésirables accrus.

Toutefois, l'utilisation des statines peut poser un problème car elles agissent au niveau de tous les organes et à une étape précoce de la synthèse du cholestérol. Nous avons mis en évidence, chez l'Homme et l'animal, que la synthèse accrue de cholestérol au niveau cérébral faisait intervenir la voie du « Bloch pathway » et se traduisait par une augmentation des concentrations tissulaires et dans le LCR du desmostérol puis du cholestérol (Article 4). Afin de bloquer spécifiquement la synthèse du cholestérol par cette voie, nous pourrions envisager d'utiliser le SH42, un bloqueur de l'enzyme terminale $\Delta 24$ -déhydrocholestérol réductase (DHCR24), permettant de transformer le desmostérol en cholestérol. L'inhibition pharmacologique de cette enzyme a récemment été montrée responsable d'une synthèse accrue d'acides gras polyinsaturés et d'une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (Körner et al. 2019). L'augmentation des concentrations de desmostérol avait par ailleurs permis une protection des neurones du striatum dans un modèle murin de la maladie de Huntington (Boussicault et al. 2016). Néanmoins, nous avons également observé une synthèse accrue périphérique de cholestérol *via* l'activation de la voie du « Kandutsch-Russel pathway » (Article 4). Ainsi, cette stratégie thérapeutique ne serait efficace que si le cholestérol synthétisé en excès au niveau périphérique n'était pas en mesure de rejoindre le compartiment cérébral à travers une BHE plus perméable à la suite de l'EME.

2.2. Favoriser l'élimination du cholestérol, quelle place pour la thérapie génique ?

Pour diminuer la concentration de cholestérol, il est possible d'inhiber sa synthèse ou bien de favoriser son élimination. La conversion du cholestérol en 24-OHc, sous la dépendance de l'enzyme CYP46A1, représente le principal mécanisme d'élimination du cholestérol neuronal (Björkhem et al. 1998).

La surexpression ciblée du gène *CYP46A1* secondaire à une injection stéréotaxique intracérébrale d'un vecteur AAV a montré des effets bénéfiques dans des modèles murins des maladies d'Alzheimer et de Huntington qui s'accompagnent également d'une accumulation cérébrale de cholestérol (Xiong et al. 2008; Burlot et al. 2015; Boussicault et al. 2016, 2018). Ces résultats prometteurs dans les maladies neurodégénératives ont abouti au développement du BC-CYP01 (Brainvectis), un vecteur viral AAV permettant de délivrer la CYP46A1 dans le cerveau de patients pour restaurer le fonctionnement normal du métabolisme du cholestérol. Un essai clinique devrait débuter prochainement avec ce produit dans la maladie de Huntington.

En dépit de sa spécificité d'action, il ne nous semble pas pertinent de surexprimer le gène *CYP46A1* chez les patients en EME. Contrairement aux résultats observés dans les maladies neurodégénératives, nous n'avons pas mis en évidence de baisse d'expression de la CYP46A1 dans les tissus post-mortem de patients décédés des suites d'un EME (Article 4). En effet, la CYP46A1 était détectée en immunohistochimie et présente à des niveaux similaires sur les analyses des western-blot. En revanche, nous avons noté une diminution significative et transitoire des concentrations de 24-OHc dans les suites de l'EME. Ces résultats, déjà observés dans le modèle murin d'EME, nous amènent à suggérer que l'EME s'accompagnerait d'une inhibition fonctionnelle de la CYP46A1. La CYP46A1 est une enzyme exprimée dans le réticulum endoplasmique. En présence d'un excès de cholestérol, cette enzyme a la capacité de migrer à la membrane et d'hydroxyler l'excès de cholestérol, non utile aux cellules gliales et neuronales, en 24-OHc. Lors d'un EME, l'enzyme CYP46A1 pourrait être « séquestrée » dans le réticulum endoplasmique (Sodero et al. 2012). Nous pourrions vérifier cette hypothèse en suivant l'expression de la CYP46A1 par microscopie électronique sur des cultures de neurones exposées à du kaïnate ou à de fortes concentrations de glutamate. L'inhibition de synthèse du 24-OHc pourrait refléter un mécanisme pathologique ou au contraire une adaptation de l'organisme à l'hyperexcitabilité.

Suite à l'atteinte cérébrale aigüe, le cerveau pourrait avoir besoin d'une concentration accrue en cholestérol pour favoriser la restauration des membranes et limiter, en réponse, l'hydroxylation du cholestérol en 24-OHc. Une fois l'EME contrôlé, la CYP46A1 pourrait de nouveau métaboliser le cholestérol en 24-OHc. Ceci pourrait expliquer que nous ayons observé une diminution transitoire des concentrations hippocampiques de 24-OHc, dans les trois premiers jours suivant l'injection de kaïnate et le début de l'EME, et une normalisation des concentrations sept jours après l'injection de kaïnate, soit lors de la période de latence sans crise (Article 4, Chali et al. 2019).

Nous pouvons envisager un second mécanisme d'adaptation : l'inhibition fonctionnelle de la CYP46A1 pourrait permettre de protéger le cerveau de la neurotoxicité induite par des concentrations trop élevées en 24-OHc (Yamanaka et al. 2011; Paul et al. 2013; Noguchi et al. 2014, 2015). Cependant, même si le 24-OHc semble capable de réguler positivement l'activité des récepteurs NMDA, il n'a montré des effets cytotoxiques que pour des concentrations supérieures à 10 μ M, soit environ 100 fois la concentration moyenne chez l'adulte (Yamanaka et al. 2011; Paul et al. 2013). Les concentrations de 24-OHc étant nettement plus élevées chez les enfants, la compagnie pharmaceutique Takeda a développé le traitement TAK-935 (OV935) afin d'inhiber, de façon compétitive, la CYP46A1 chez les enfants présentant des syndromes épileptiques rares (Lennox-Gastaut, Dravet). Ce traitement a montré un potentiel antiépileptique dans le modèle murin d'épilepsie généralisée *SCN1A* (modèle du syndrome de Dravet) et dans le modèle pentylenetetrazole (Bialer et al. 2018). Un essai de phase 2, contre placebo, est en cours pour s'assurer de la sécurité à long terme du traitement alors qu'un premier essai de phase 1 avait montré une bonne tolérance et une réduction de 28% des crises dans le groupe traité, contre 3% dans le groupe placebo, par rapport à la période initiale d'évaluation (Takeda 2021). Ce traitement semble efficace pour les enfants souffrant de syndromes épileptiques rares associés à une épilepsie fréquemment pharmaco-résistante. En revanche, l'inhibition pharmacologique de la CYP46A1 lors d'un EME, chez l'adulte, pourrait être délétère en accentuant la synthèse accrue de cholestérol par perte du rétrocontrôle négatif du 24-OHc sur les SREBP. Cette dualité met en lumière l'importance d'une fine régulation du métabolisme du cholestérol chez les patients épileptiques.

2.3. Favoriser l'estérification du cholestérol, quels outils ?

Nous avons mis en évidence chez les patients en EME que la synthèse accrue de cholestérol au niveau périphérique s'accompagnait de changements de répartition des lipoprotéines, et notamment d'une baisse du HDL-cholestérol, reflétée par une diminution de l'estérification du cholestérol. Or, l'augmentation de l'estérification du cholestérol pourrait favoriser son retour au foie, sa dégradation en acides biliaires et limiter le risque d'un passage du cholestérol synthétisé en excès au niveau périphérique jusqu'au cerveau.

Même si aucun médicament hypocholestérolémiant commercialisé n'a d'action directe sur l'enzyme LCAT, différentes approches thérapeutiques ont été envisagées pour surexprimer cette enzyme : un activateur de la LCAT, une version recombinante de la LCAT (ACP-51) ou un anticorps monoclonal agoniste de l'enzyme (DS-8190a) (Gunawardane et al. 2016; Norum et al. 2020). Ces stratégies thérapeutiques ont été proposées pour le traitement de la déficience familiale en LCAT, une pathologie qui s'accompagne d'une baisse du HDL-cholestérol, d'une susceptibilité accrue à l'athérosclérose, d'une anémie, d'une opacité de la cornée et d'atteintes rénales. L'ensemble de ces stratégies thérapeutiques a permis d'augmenter l'activité de la LCAT et de normaliser les concentrations en HDL-cholestérol (Gunawardane et al. 2016; Norum et al. 2020; Sasaki et al. 2021). L'utilisation de la forme recombinante de LCAT a montré des résultats bénéfiques après une administration intraveineuse dans des modèles murins de la déficience familiale en LCAT (Norum et al. 2020). Son utilisation chez les patients en EME pourrait permettre de normaliser les concentrations en HDL-cholestérol, diminuées de près de 60% en cas d'EME prolongé super-réfractaire, et les concentrations en cholestérol estérifié, diminuées de plus 40% chez les patients en EME prolongé super-réfractaire (Article 4). Toutefois, aucune étude n'a évalué la capacité de ces molécules à franchir la BHE. Favoriser l'élimination du cholestérol produit en excès au niveau périphérique ne serait probablement pas suffisant pour prévenir les lésions cérébrales provoquées par une accumulation de cholestérol au niveau neuronal.

2.4. Inhibition du transport du cholestérol, quels outils ?

Chez l'adulte, la synthèse cérébrale de cholestérol se déroule majoritairement dans les astrocytes et fait intervenir la voie du « Bloch pathway ». Le cholestérol synthétisé est par la suite transféré aux neurones, couplé à l'ApoE.

Or, nous avons mis en évidence une augmentation des concentrations de desmostérol, précurseur clé de la voie du « Bloch pathway » à la suite d'un EME, et confirmé l'augmentation de l'ApoE cérébrale chez les souris qui ont reçu une injection de kaïnate (Article 4). Ces résultats nous permettent de supposer que l'EME s'accompagne d'une synthèse accrue de cholestérol par les astrocytes et d'un transfert excessif du cholestérol couplé à l'ApoE jusqu'aux neurones. Nous pouvons par conséquent nous interroger sur l'intérêt d'un traitement anti-ApoE pour limiter l'apport de cholestérol des astrocytes jusqu'aux neurones. L'utilisation d'un tel traitement pourrait par ailleurs permettre de décroître le stockage du cholestérol dans les tissus périphériques.

Même si aucun anti-ApoE n'est actuellement commercialisé, l'utilisation d'oligonucléotides « antisense » et d'anticorps monoclonaux a été envisagée pour réduire les niveaux d'ARNm ou de protéine et décroître la formation des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer (Yang et al. 2021). Toutefois, le manque de spécificité de ces approches et le risque important d'effets collatéraux limitent fortement l'utilisation de ces molécules.

Les stratégies thérapeutiques envisagées, leurs avantages et inconvénients sont représentées sur la Figure 35.

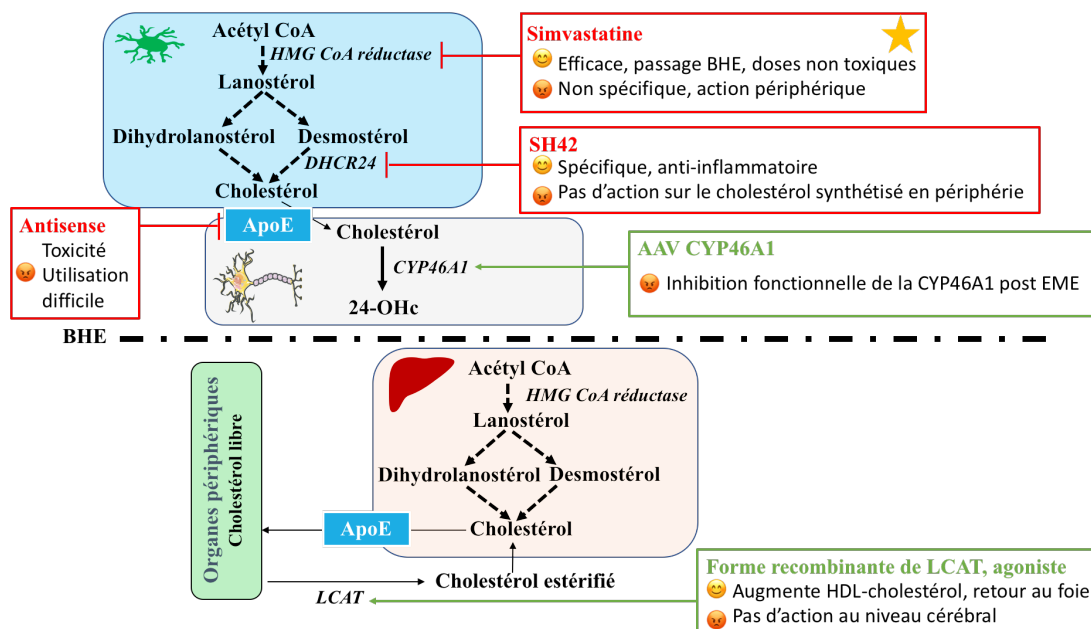


Figure 35 : Bilan des stratégies thérapeutiques envisageables pour moduler le métabolisme du cholestérol dans les états de mal épileptiques.

2.5. Comment intégrer le traitement hypocholestérolémiant à la prise en charge de l'état de mal épileptique ?

Les premières études rapportant un risque d'épilepsie plus faible chez les patients traités par des statines laissaient penser que les statines pourraient, en inhibant la synthèse du cholestérol ou *via* leurs effets anti-inflammatoire et anti-oxydant, prévenir le développement d'un EME (Pugh et al. 2009; Etminan et al. 2010). En revanche, nos résultats semblent plutôt témoigner d'une modification du métabolisme du cholestérol secondaire à l'initiation de l'EME. En effet, les premières crises d'épilepsie ont été enregistrées en moyenne 76 minutes après l'injection de kaïnate, tandis que l'augmentation des concentrations de desmostérol n'a été observée que trois jours après le début de l'EME (Article 4 ; résultats partie 3). Par ailleurs, seuls les patients qui présentaient un EME prolongé super-réfractaire avec des crises depuis plus de sept jours avaient des concentrations de lanostérol et de dihydrolanostérol augmentées au niveau plasmatique (Article 4). Enfin, aucune modification du métabolisme du cholestérol n'a été observée chez les patients présentant une épilepsie sans EME (Article 4). A la vue de ces résultats, il ne semble pas pertinent de proposer un traitement hypocholestérolémiant à l'ensemble des patients souffrant d'une épilepsie pharmaco-résistante en prévention d'un EME. De même, un traitement neuroprotecteur ne semble pas utile pour les patients présentant un EME non-réfractaire avec un faible risque de séquelles associées. En revanche, la synthèse accrue de cholestérol cérébral et son accumulation dans les neurones pourraient favoriser la poursuite de l'EME réfractaire et accentuer sa toxicité. Ainsi, un traitement hypocholestérolémiant pourrait être proposé, en complément du traitement anesthésique et antiépileptique, pour la prévention des lésions cérébrales et de l'épilepsie séquellaire chez des patients admis en réanimation pour un EME réfractaire. L'instauration du traitement devrait être effectuée de façon précoce afin d'empêcher la synthèse accrue de cholestérol cérébral et périphérique induite par la perte du rétrocontrôle négatif du 24-OHc sur les SREBP.

Nous avons vu précédemment que la simvastatine semble présenter le meilleur profil pour prévenir la synthèse, accrue et délétère, de cholestérol chez les patients en EME. Ce médicament a présenté des résultats prometteurs dans des modèles murins d'EME à une concentration de 1 mg/kg par jour (résultats partie 3 ; (Xie et al. 2011)). Cette concentration est similaire à celle utilisée pour le traitement de l'hypercholestérolémie chez l'Homme et ne devrait par conséquent pas poser de problème de toxicité.

En revanche, la simvastatine est commercialisée, en France, sous la forme de comprimés non sécables et non broyables ce qui limite dès lors son utilisation chez des patients anesthésiés, intubés et ventilés. Toutefois, une solution orale de simvastatine est commercialisée aux États-Unis (Flolipid) et au Royaume-Uni (Rosemont UK) et pourrait être importée pour vérifier l'efficacité du traitement chez l'Homme.

Les EME peuvent durer plusieurs minutes, jours voire semaines. Par conséquent, il est nécessaire de définir la durée de traitement idéale par la simvastatine. Nous pensons que la simvastatine pourrait être utilisée en association au traitement sédatif et être poursuivie pendant la première semaine suivant la levée des sédations pour prévenir la reprise des crises. Un suivi des concentrations de cholestérol libre sérique pourrait être effectué afin de vérifier l'efficacité du traitement, et d'adapter, si nécessaire, la durée d'administration.

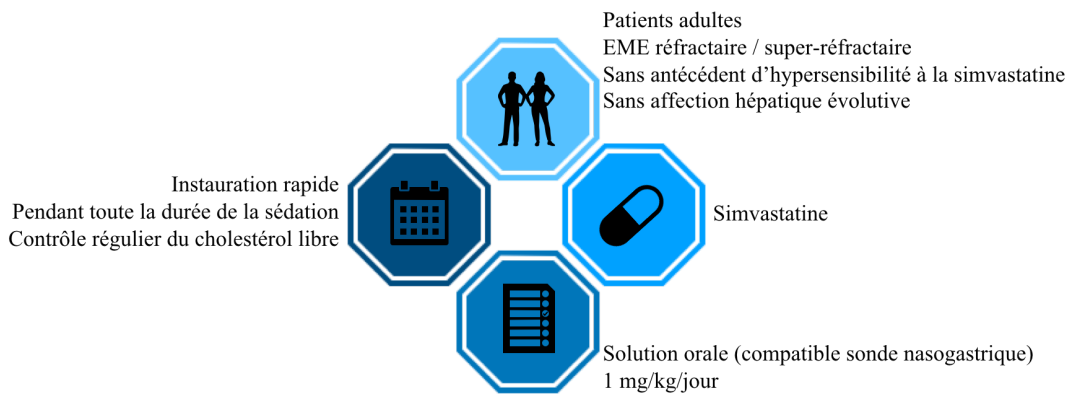


Figure 36 : Modalités d'utilisation de la simvastatine dans l'état de mal épileptique.

3. Quelle place pour les biomarqueurs biochimiques dans l'évaluation pronostique des patients en état de mal épileptique ?

Au cours de ma thèse, j'ai développé par des approches d'intelligence artificielle de nouveaux scores clinico-biologiques permettant d'optimiser l'évaluation pronostique de tout patient admis en réanimation pour un EME. Nos outils ont été conçus pour répondre aux questions suivantes :

- Quel est le risque que le patient perde de son autonomie dans les suites de l'EME ?
- Quel degré de perte d'autonomie peut-on envisager à court et à long terme?
- Quel est le risque que le patient décède dans les suites immédiates de l'EME ?
- Quelles sont ses chances de récupération de son autonomie à distance de l'EME ?

Nous discuterons dans cette troisième partie la plus-value de nos outils par rapport aux échelles pronostiques disponibles et leur possibilité d'utilisation en pratique clinique courante.

3.1. L'intelligence artificielle en neuroréanimation

Si les outils d'intelligence artificielle se développent de plus en plus à l'hôpital et permettent d'envisager une médecine personnalisée, l'utilisation de tels outils en neuroréanimation reste ponctuelle (Chaudhry et al. 2020). Les patients de neuroréanimation nécessitent fréquemment une prise en charge multimodale avec des évaluations neurologiques, des bilans biologiques, une surveillance continue de paramètres physiologiques, des imageries et des EEG. Le volume important de données acquises pourrait être traité de façon efficace avec les outils d'intelligence artificielle. Les premières études ayant eu recours à ces techniques en neuroréanimation ont été conduites pour : (i) optimiser l'évaluation des troubles de conscience (Claassen et al. 2019; Rohaut et al. 2019), (ii) prédire l'augmentation de la pression intracrânienne dans les suites d'un traumatisme crânien (Güiza et al. 2013; Raj et al. 2019), (iii) prédire le risque d'hémorragie intracérébrale et réduire le délai de prise en charge des patients (Arbabshirani et al. 2018), (iv) prédire le risque de vasospasme dans les suites d'une hémorragie subarachnoïdienne (Tanioka et al. 2019), ou (v) faciliter la détection des crises sur des enregistrements EEG continus de longue durée (Koren et al. 2018; Sharpe et al. 2019; Struck et al. 2019). Deux études ont, par ailleurs, proposé d'utiliser des outils d'intelligence artificielle pour l'évaluation pronostique des patients admis pour une hémorragie subarachnoïdienne ou un traumatisme crânien (Hernandes Rocha et al. 2019; Stapleton et al. 2019). En revanche, aucune étude n'a été conduite pour prédire le pronostic des patients admis pour un EME.

3.2. Apport des scores clinico-biologiques

Pour mieux prendre en charge les patients en EME, il est important de disposer d'outils permettant de prédire efficacement la récupération d'une bonne autonomie en sortie de réanimation mais surtout à distance de l'EME. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, quatre échelles pronostiques ont été développées ces quinze dernières années pour prédire le risque de mortalité ou de dégradation des capacités fonctionnelles à court terme (Rossetti et al. 2006; Leitinger et al. 2015b; Gao et al. 2016; González-Cuevas et al. 2016). En revanche, aucune ne peut être utilisée pour prédire efficacement et de façon répétée, le pronostic de tout patient admis en réanimation pour un EME. En effet, les échelles STESS et mSTESS, bien qu'applicables à tous les patients, reposent sur des données obtenues avant le début d'un traitement et ne permettent ainsi pas de suivre l'évolution du patient (Rossetti et al. 2006; González-Cuevas et al. 2016). L'algorithme EMSE ne peut être appliqué que pour certaines étiologies (Leitinger et al. 2015b), tandis que l'échelle END-IT nécessite la réalisation d'une IRM (Gao et al. 2016).

*** Prédiction du risque de perte d'autonomie en sortie de réanimation**

Au cours de ce travail, nous avons proposé deux outils, obtenus par régression logistique et par une machine à support de vecteurs (SVM, *support vector machine*), pour prédire le pronostic des patients en sortie de réanimation. En accord avec les données de la littérature, nous avons trouvé un risque plus important de « mauvais pronostic » (défini comme le décès ou la dégradation des capacités fonctionnelles) pour les patients admis avec un EME réfractaire ou pour ceux présentant une durée d'EME élevée. Le pronostic était en revanche meilleur pour les patients qui avaient des antécédents d'épilepsie (Rossetti et al. 2006; Leitinger et al. 2015b, 2019; Marawar et al. 2018; Alkhachroum et al. 2020).

Notre premier outil obtenu par SVM nécessite de combiner 11 variables pour prédire efficacement le pronostic en sortie de réanimation. Les variables retenues peuvent être obtenues facilement et reflètent (i) des atteintes non-neurologiques (dysfonction hépatique et lipidique : cholestérol total, HDL-cholestérol, lipoprotéine(a), aspartate aminotransférase ; dysfonction rénale : urée, créatinine ; dysfonction systémique : potassium, ions chlorures) (Ciurans et al. 2018), (ii) l'inflammation résultante de l'EME (progranuline, protéine S100-bêta) (Zhu et al. 2013), et (iii) la sévérité de la maladie reflétée par la durée de l'EME avant l'inclusion du patient (Marawar et al. 2018).

Dans notre cohorte d'étude, ce modèle était capable de prédire le mauvais pronostic des patients avec une AUC de 0,75, représentant une amélioration de 19% en comparaison au STESS et de 42% en comparaison au mSTESS. Notre modèle était également capable de prédire que l'EME n'aurait pas de conséquences sur l'autonomie des patients, c'est-à-dire un score de Rankin identique en sortie de réanimation en comparaison au score initial, pré-EME, pour 76% des patients.

Notre second outil obtenu par régression logistique permet de prédire le pronostic d'un patient admis pour un EME à l'aide d'un marqueur clinique (le caractère réfractaire de l'EME) et deux marqueurs biologiques (le cholestérol libre et les phospholipides).

Les patients admis avec un EME réfractaire avaient un risque accru de présenter une dégradation de leur autonomie tout comme les patients présentant des concentrations élevées de cholestérol libre. Nous avons vu précédemment que l'accumulation de cholestérol dans les neurones pouvait induire une mort neuronale (Chali et al. 2015). Nous pouvons supposer que cette mort neuronale pourrait s'accompagner de séquelles neurocognitives résultant en une dégradation des capacités fonctionnelles du patient. A l'inverse, les patients présentant des concentrations élevées de phospholipides avaient plus fréquemment un bon pronostic. Les phospholipides sont des composés essentiels des membranes cellulaires, impliqués dans le bon fonctionnement des protéines transmembranaires (Adibhatla and Hatcher 2008). Une diminution des concentrations de phospholipides est responsable de changements dans la conformation des protéines de membrane et de modifications de l'activité des pompes Ca^{2+} -ATPase, Na^+ , K^+ -ATPase et des protéines SREBP (Maxfield and Tabas 2005). L'atteinte de ces protéines pourrait résulter en des dysfonctions cellulaires et entraîner des séquelles secondaires.

La combinaison du caractère réfractaire de l'EME, des concentrations de cholestérol libre et de phospholipides permettait de prédire, dans notre cohorte, le pronostic avec une AUC de 0,78, soit avec une amélioration de 24% par rapport au STESS et 47% par rapport au mSTESS. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec le premier outil SVM pour prédire le mauvais pronostic. Toutefois, les performances de notre modèle SVM étaient meilleures pour prédire l'absence d'impact de l'EME sur l'autonomie des patients.

*** Prédiction du degré de perte d'autonomie en sortie de réanimation**

S'il est intéressant de prédire quels patients sont à risque de présenter une aggravation clinique en sortie de réanimation, il est d'autant plus important de pouvoir estimer le degré de dégradation afin d'orienter l'équipe médicale et la famille vers la prise en charge ultérieure. Dans cette optique, nous avons développé, par régression linéaire, un score nous permettant d'estimer le degré de dégradation à la sortie de réanimation. Ce score repose sur la combinaison d'un marqueur clinique (l'état du patient avant son EME, reflété par son score de Rankin initial) et deux marqueurs biologiques (la créatinine et la protéine S100-bêta dosées au niveau sérique). Les patients ayant un score de Rankin initialement faible (quasi absence de dépendance) étaient plus à même de présenter un fort degré de dégradation en sortie de réanimation. Ce résultat peut s'expliquer par notre population d'étude : 22% de nos patients ont présenté un EME réfractaire *de novo* (NORSE). Cette entité représente la forme la plus sévère d'EME et concerne fréquemment des patients jeunes sans antécédents médicaux (Hirsch et al. 2018). Ces patients présentent des EME de longue durée nécessitant une prise en charge en réanimation parfois pendant plusieurs mois. A leur sortie, ils ont souvent des séquelles cognitives et motrices qui les rendent dépendants pour les actes de la vie quotidienne. Le fort pourcentage de NORSE dans notre cohorte reflète un biais de sélection : la majorité de nos patients ont été inclus dans l'unité de neuroréanimation de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, spécialisée dans la prise en charge des EME super-réfractaires.

Les patients présentant des concentrations sériques élevées de la protéine S100-bêta étaient également plus à même de se dégrader intensément. A des concentrations élevées, la protéine S100-bêta peut favoriser l'apoptose et l'expression de cytokines pro-inflammatoires et induire, en conséquence, un fort degré de dégradation fonctionnelle (Sen and Belli 2007). Les patients ayant des concentrations basses de créatinine étaient également plus à risque de présenter un fort degré de dégradation. La diminution des concentrations de créatinine peut refléter l'atrophie musculaire induite par un séjour prolongé en réanimation. En raison de la neuropathie de réanimation, les patients sont fréquemment dépendants à la marche en sortie de réanimation, avec, en conséquence, un score de Rankin supérieur à 3.

*** Prédiction du risque de mortalité à court terme**

En comparaison aux données de la littérature, nous n'avons pas mis en évidence de plus grand risque de mortalité pour les patients âgés, les patients présentant un EME de cause aigüe ou bien les patients avec un EME réfractaire (Rossetti et al. 2006; Leitinger et al. 2015b; Marawar et al. 2018; Alkhachroum et al. 2020).

Ceci peut également refléter un biais de sélection : nos patients présentant un EME super-réfractaire d'étiologie aigüe étaient majoritairement jeunes et ont évolué favorablement sous immunothérapie.

Notre outil obtenu par SVM nécessite de combiner 10 variables pour prédire le plus efficacement possible le risque de mortalité en sortie de réanimation (AUC de 0,73). Il résultait en une amélioration de 30% de l'AUC en comparaison au STESS et de 18% par rapport au mSTESS. Les 10 variables utilisées par le classificateur SVM sont disponibles en routine et reflètent des atteintes non-neurologiques (dysfonction hépatique et lipidique : triglycérides, apolipoprotéines B et E, cholestérol libre, aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase ; dysfonction rénale : urée, créatinine ; dysfonction systémique : sodium, potassium) dont une partie est connue pour favoriser le développement d'un EME et/ou impacter son pronostic (Gaspard et al. 2015; Sonneville et al. 2016).

Notre modèle permet de prédire la survie de 94% des patients et le décès de 41% des patients. Il semble présenter une moindre capacité à identifier les patients à risque de décès que l'échelle EMSE (Leitinger et al. 2015b). L'échelle EMSE prend en compte l'étiologie de l'EME tandis que le classificateur SVM ne permet pas d'intégrer de façon simultanée des données binaires (ex : étiologie aigüe, présence ou absence) et des données continues (ex : concentrations d'un biomarqueur). Néanmoins, il est important de rappeler l'hétérogénéité des performances de l'échelle EMSE pour la prédiction du risque de décès (Leitinger et al. 2015b; Pacha et al. 2016; Giovannini et al. 2017; Ciurans et al. 2018; Yechoor et al. 2018). Nous devons par ailleurs noter que près de 80% de nos patients sont décédés consécutivement à une limitation ou un arrêt des thérapeutiques actives. En conséquence, les variables sélectionnées et les performances du modèle auraient pu être différentes dans des centres appliquant d'autres protocoles.

*** Prédiction du pronostic à distance de l'EME**

Aucun outil ne permettait jusqu'alors l'estimation du pronostic des patients à distance de l'EME. Disposer de tels outils est très important dans la prise en charge des patients : une forte probabilité de récupération à long-terme pourrait inciter les cliniciens à poursuivre des traitements antiépileptiques et une anesthésie générale sur une période prolongée plutôt que de recourir à un arrêt des thérapeutiques actives. De plus, de tels outils apporteraient une visibilité aux familles. Au cours de ma thèse, nous avons développé un outil permettant de prédire, pour les patients qui se sont dégradés en sortie de réanimation, les chances de récupération de leur autonomie à distance de l'EME (en moyenne 6 à 12 mois après la sortie d'hospitalisation).

Notre outil obtenu par SVM repose sur l'association de 12 variables et prédit avec une AUC de 0,86 les chances de récupération à distance de l'EME. Les variables retenues reflètent (i) des atteintes non-neurologiques (dysfonction hépatique et lipidique : apolipoprotéine B, cholestérol libre, gamma GT ; dysfonction rénale : urée, créatinine ; dysfonction systémique : sodium, ions chlorures) (Ciurans et al. 2018), (ii) l'atteinte cérébrale induite par l'EME (NSE sérique) (DeGiorgio et al. 1996), et (iii) la sévérité de l'EME reflétée par sa durée (Marawar et al. 2018). L'âge et le score de Rankin initial du patient ont également été retenus, tout comme la concentration en phospholipides. Les patients jeunes sans antécédents médicaux présentaient de plus grandes chances de récupération, tout comme les patients avec des concentrations élevées de phospholipides. Nous pouvons suggérer que ces patients avaient des atteintes cérébrales plus légères avec, en conséquence, de meilleures chances de récupération.

3.3. Comment intégrer ces outils à la prise en charge clinique de l'état de mal épileptique ?

L'utilisation des outils d'intelligence artificielle pour l'évaluation pronostique des patients en réanimation semble limitée par trois facteurs principaux :

- Considération éthique : les outils d'intelligence artificielle ne possèdent qu'une capacité modérée à prédire le risque de décès dans les suites d'un EME, avec des valeurs prédictives positives comprises entre 20 et 69%. Ainsi, dans 31 à 80% des cas, un décès est pronostiqué pour des patients qui ont survécu à l'EME (faux positifs). Il n'est donc pas envisageable de recourir uniquement à ces outils pour décider de limiter les thérapeutiques actives. De même, notre échelle d'évaluation, le score modifié de Rankin, ne permet pas de distinguer (i) les patients avec un mauvais pronostic secondaire à des séquelles neurologiques périphériques (neuropathie périphérique ou myopathie de réanimation), qui ont de grandes chances de récupération, et (ii) les patients présentant des séquelles neurologiques centrales, plus souvent irréversibles. Aussi, un score pronostic à distance défavorable ne doit pas inciter les cliniciens à limiter les thérapeutiques actives.
- Manque de visibilité, problème « *black box* » : en fonction du modèle statistique utilisé (réseaux de neurones, SVM, régression logistique ou linéaire, ...), nous avons une visibilité plus ou moins importante sur les variables retenues dans le modèle et leur poids relatif. Les cliniciens ne peuvent ainsi pas tenir compte des antécédents des patients et des comorbidités pour interpréter les données.

De plus, ces outils « complexes » ne sont pas facilement accessibles. Le recours à des dispositifs mobiles (tablettes, applications, ...) pourrait permettre de faciliter le déploiement et l'utilisation de ces outils dans les services cliniques (The Lancet Respiratory Medicine 2018).

- Homogénéité des populations : la reproductibilité des méthodes d'intelligence artificielle est un problème majeur car les performances observées dans une cohorte pourraient ne pas être généralisables à d'autres cohortes (Hutson 2018). Afin de favoriser une meilleure adaptation de nos outils à de futures cohortes et de contrôler les performances de nos modèles, nous avons utilisé une procédure de validation croisée à 1000 tirages suivie d'une procédure de permutation à 1000 tirages également. La procédure de validation croisée nous a permis de nous assurer que, quel que soit l'échantillon retenu pour l'apprentissage, les données resteraient applicables pour le groupe de test. Ainsi, à l'avenir, les patients de la cohorte d'origine pourront être utilisés comme groupe d'apprentissage pour évaluer le pronostic d'un nouveau patient représentant dès lors le groupe test. La procédure de permutation nous a permis de nous assurer que les effets observés n'étaient pas dus au hasard et que les variables retenues avaient réellement un poids sur l'évolution pronostique des patients.

Contrairement aux échelles précédemment publiées, nos outils peuvent être utilisés pour estimer le pronostic de tous les patients admis pour EME et ce de façon répétée au cours de leur prise en charge. Ces outils pourraient par conséquent être utilisés pour suivre l'impact de l'ajout d'un nouvel antiépileptique ou d'une stratégie neuroprotectrice sur le pronostic des patients. Ils permettent également, en intégrant des données biochimiques, de suivre des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la toxicité de l'EME et ses conséquences. Par ailleurs, ces outils pourraient également être utilisés pour identifier une cohorte de patients ayant un pronostic homogène pour la réalisation de futurs essais thérapeutiques dans l'EME afin de pouvoir estimer, sans biais de population, l'impact d'un traitement.

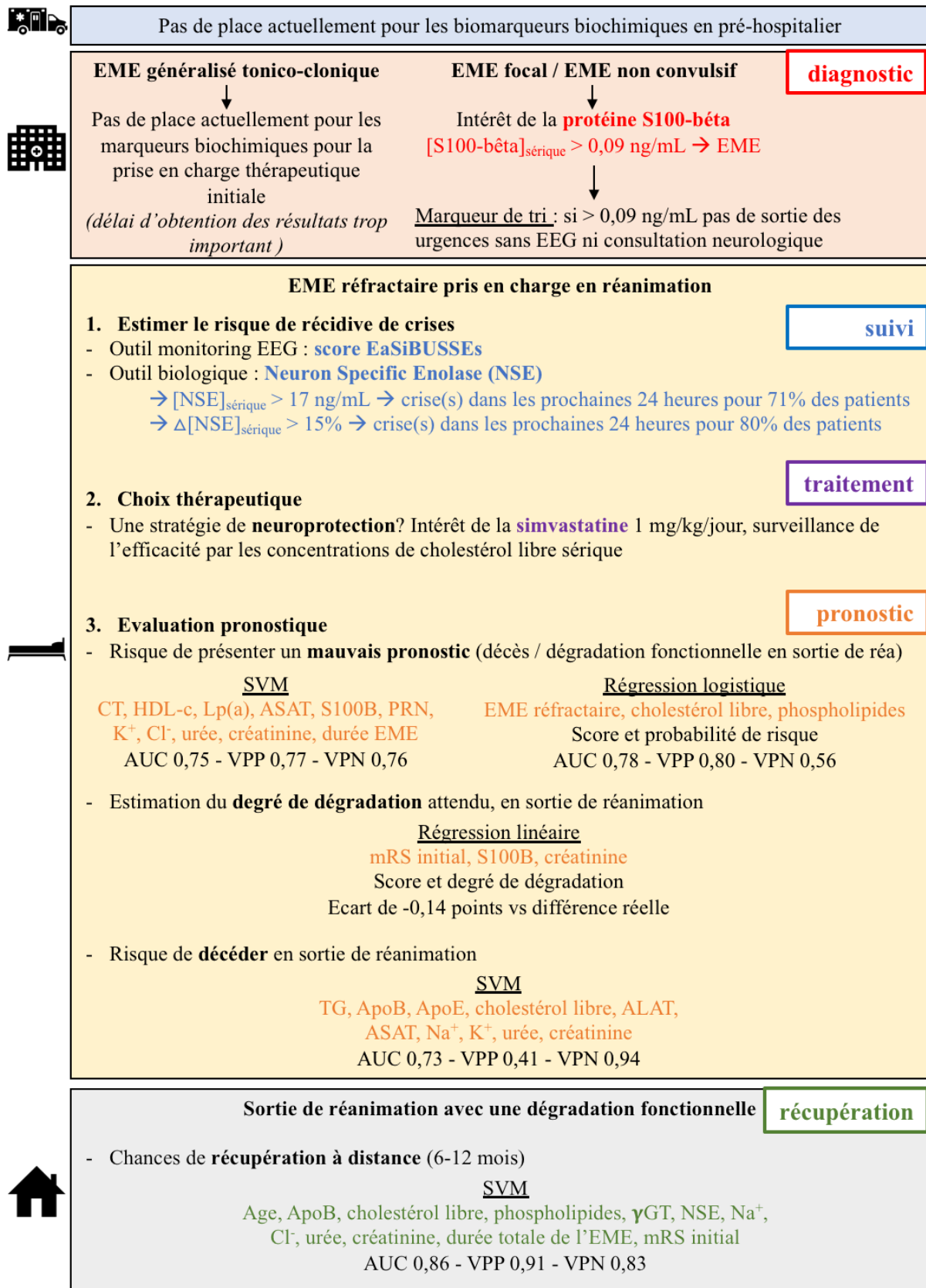
Conclusion et perspectives

Tout au long de ce travail, nous avons mis en évidence que de nombreuses molécules étaient sur-exprimées ou sous-exprimées dans les suites d'un EME. Pour pouvoir être utilisées comme des biomarqueurs de l'EME, nous avons fixé les critères suivants : les molécules doivent pouvoir être dosées dans le sang, de façon rapide et reproductible par tout laboratoire de biochimie. Nous avons mis en évidence des performances inégales des différents biomarqueurs selon les objectifs fixés : aide au diagnostic, suivi des patients, orientation thérapeutique ou évaluation pronostique. Nous avons donc conclu qu'il n'y a pas un mais des biomarqueurs de l'EME.

Nos résultats principaux peuvent être résumés par les quatre points suivants :

- 1) La protéine S100-bêta, dosée au niveau sérique, pourrait être utilisée comme un marqueur de tri et d'aide au diagnostic des EME au service des urgences.
- 2) En cas d'EME réfractaire avéré, un dosage quotidien sérique de la NSE pourrait être utilisé pour le suivi des patients, afin d'appréhender les anomalies électroencéphalographiques à haut risque d'évolution vers des crises voire de pérennisation d'un EME et de prédire le risque de récurrence de crise dans les prochaines 24 heures.
- 3) L'EME s'accompagne de modifications du métabolisme du cholestérol cérébral et périphérique et notamment d'une synthèse accrue et délétère de cholestérol. Nous avons obtenu des résultats préliminaires prometteurs, dans un modèle murin d'EME, suggérant l'utilisation de la simvastatine comme stratégie neuroprotectrice.
- 4) La combinaison des données cliniques et biologiques permet d'optimiser l'évaluation pronostique des patients en EME. Nous avons proposé de nouveaux outils permettant (i) de prédire le risque de perte d'autonomie pour un patient admis en EME, (ii) d'estimer le degré de dégradation, (iii) de prédire le risque de décès en réanimation et (iv) en cas de survie, d'estimer les chances de récupération à distance de l'EME.

La Figure 37 représente l'intérêt et la place des différents biomarqueurs biochimiques au cours de la prise en charge d'un patient en EME.



CT = cholestérol total, Lp(a) = lipoprotéine (a) ; mRS initial = score de Rankin pré EME ; PRN = progranuline

Figure 37 : Quel(s) marqueur(s) pour quel(s) objectif(s) ?

Ces travaux ont ouvert la voie à l'utilisation des marqueurs biochimiques dans la prise en charge de l'EME. Néanmoins, plusieurs questions restent en suspens.

1. Comment le cholestérol exerce-t-il une action délétère ?

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence une synthèse accrue de cholestérol secondaire à l'EME. Si l'accumulation de cholestérol dans les neurones a précédemment été montrée responsable d'une mort neuronale et de l'émergence de crises spontanées, les mécanismes responsables de la toxicité du cholestérol ne sont pas formellement identifiés (Chali et al. 2015). Plusieurs hypothèses ont été évoquées, un excès de cholestérol pourrait : (i) rendre les membranes plasmiques plus visqueuses et donc empêcher les mouvements des récepteurs NMDA hors de la synapse, l'internalisation des récepteurs NMDA, et entraîner une augmentation du nombre de récepteurs NMDA dans les radeaux lipidiques (Ponce et al. 2008), (ii) augmenter la fréquence d'ouverture du canal ionique associé aux récepteurs NMDA (Korinek et al. 2015), ou encore (iii) favoriser un effet pro-inflammatoire (Pappalardo et al. 2020). Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la toxicité du cholestérol pourrait nous permettre de comprendre par quel(s) mécanisme(s) la simvastatine exerce son action protectrice et éventuellement de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques à action plus ciblée que la simvastatine.

2. Quels sont les autres mécanismes physiopathologiques impliqués dans la toxicité de l'EME ?

Le cholestérol semble jouer un rôle important dans l'excitotoxicité observée secondairement à l'EME. Toutefois, ce mécanisme ne peut expliquer, à lui seul, les conséquences de l'EME. Nous avons débuté, au cours de ce travail, une étude de métabolomique qui nous a permis d'identifier par une approche non ciblée les voies métaboliques perturbées dans l'EME. La poursuite de ce travail va nous permettre de caractériser les changements induits par l'EME dans chacune des voies et d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. Il sera intéressant, dans un second temps, d'étudier s'il existe un lien entre le niveau d'expression de certains métabolites et le pronostic des patients.

3. Quelles sont les voies métaboliques perturbées spécifiquement dans les NORSE ?

Au cours de ce travail, nous avons tenté d'identifier des biomarqueurs de l'EME ou des marqueurs de suivi des EME réfractaires, sans distinction d'étiologie. Au sein des EME réfractaires, il existe un sous-groupe d'EME de gravité accrue : les états de mal épileptiques réfractaires *de novo* (NORSE).

Les mécanismes responsables du développement des NORSE sont mal connus à ce jour. Cependant, de nombreux arguments suggèrent un dysfonctionnement de l'immunité et ces patients sont empiriquement traités par des traitements immunomodulateurs, avec une efficacité cependant variable (Tan et al. 2021). L'identification de biomarqueurs biochimiques permettant de guider la stratégie thérapeutique serait particulièrement utile pour ces patients qui présentent actuellement les pronostics les plus défavorables.

Nous avons observé, de façon préliminaire, qu'une augmentation des concentrations plasmatiques de progranuline pouvait orienter sur la nécessité d'un traitement immunomodulateur (Article 1). En revanche, nos résultats ne permettent pas actuellement de guider le choix de l'immunothérapie. Dans cette optique, nous avons débuté une collaboration avec le département d'Immunologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière (Pr. Gorochov) pour réaliser un large bilan cytokinique pour tout patient présentant un NORSE et de façon répétée au cours de la prise en charge. Ces nouvelles analyses pourraient nous permettre d'identifier des groupes de patients présentant un profil cytokinique similaire, pouvant dès lors nous orienter vers une stratégie thérapeutique commune telle que des anticorps spécifiques (ex : anti-IL17, anti-IL8). Par ailleurs, nous allons débiter, dans le cadre de mon post-doctorat, une collaboration avec les départements de Neurologie et d'Immunologie de l'Université de Yale (New Haven, USA) (Pr. Hafler, Pr. Hirsch) afin de caractériser l'état des lymphocytes T par une analyse transcriptomique de tissus post-mortem, tissus issus de biopsie cérébrale et de LCR de patients présentant un NORSE « cryptogénique » (soit sans diagnostic posé en dépit d'explorations larges), en comparaison à une population témoin. Ces analyses nous permettront d'améliorer significativement la compréhension du rôle des lymphocytes T dans l'initiation du NORSE cryptogénique et sa toxicité à long terme.

Références

- Adibhatla RM, Hatcher JF. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem.* 2008;49:241–68.
- Aicua-Rapun I, André P, Rossetti AO, Decosterd LA, Buclin T, Novy J. Intravenous brivaracetam in status epilepticus: Correlation between loading dose, plasma levels and clinical response. *Epilepsy Res.* 2019 Jan;149:88–91.
- Alapirtti T, Rinta S, Hulkkonen J, Mäkinen R, Keränen T, Peltola J. Interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta production in patients with focal epilepsy: A video-EEG study. *J Neurol Sci.* 2009 May 15;280(1–2):94–7.
- Alkhachroum A, Der-Nigoghossian CA, Rubinos C, Claassen J. Markers in Status Epilepticus Prognosis. *J Clin Neurophysiol.* 2020 Sep;37(5):422–8.
- Allredge BK, Gelb AM, Isaacs SM, Corry MD, Allen F, Ulrich S, et al. A comparison of lorazepam, diazepam, and placebo for the treatment of out-of-hospital status epilepticus. *N Engl J Med.* 2001 Aug 30;345(9):631–7.
- Alsherbini K, Abhi Pandhi F, Goyanes J, Deep A, Jones GM. A retrospective, observational study of perampanel in refractory and super-refractory status epilepticus. *J Neurol Sci.* 2020 Dec 15;419:117214.
- Alvarez V, Januel J-M, Burnand B, Rossetti AO. Second-line status epilepticus treatment: comparison of phenytoin, valproate, and levetiracetam. *Epilepsia.* 2011 Jul;52(7):1292–6.
- Alvarez V, Westover MB, Drislane FW, Dworetzky BA, Curley D, Lee JW, et al. Evaluation of a clinical tool for early etiology identification in status epilepticus. *Epilepsia.* 2014 Dec;55(12):2059–68.
- Alvarez V, Lee JW, Drislane FW, Westover MB, Novy J, Dworetzky BA, et al. Practice variability and efficacy of clonazepam, lorazepam, and midazolam in status epilepticus: A multicenter comparison. *Epilepsia.* 2015 Aug;56(8):1275–85.
- Amatniek JC, Hauser WA, DelCastillo-Castaneda C, Jacobs DM, Marder K, Bell K, et al. Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia.* 2006 May;47(5):867–72.
- Appleton R, Sweeney A, Choonara I, Robson J, Molyneux E. Lorazepam versus diazepam in the acute treatment of epileptic seizures and status epilepticus. *Dev Med Child Neurol.* 1995 Aug;37(8):682–8.
- Araújo IM, Gil JM, Carreira BP, Mohapel P, Petersen A, Pinheiro PS, et al. Calpain activation is involved in early caspase-independent neurodegeneration in the hippocampus following status epilepticus. *J Neurochem.* 2008 May;105(3):666–76.

- Arbabshirani MR, Fornwalt BK, Mongelluzzo GJ, Suever JD, Geise BD, Patel AA, et al. Advanced machine learning in action: identification of intracranial hemorrhage on computed tomography scans of the head with clinical workflow integration. *NPJ Digit Med*. 2018;1:9.
- Asadollahi M, Simani L. The diagnostic value of serum UCHL-1 and S100-B levels in differentiate epileptic seizures from psychogenic attacks. *Brain Res*. 2019 Feb 1;1704:11–5.
- Atmaca MM, Bebek N, Baykan B, Gökyiğit A, Gürses C. Predictors of outcomes and refractoriness in status epilepticus: A prospective study. *Epilepsy Behav*. 2017 Oct;75:158–64.
- Banach M, Czuczwar SJ, Borowicz KK. Statins - are they anticonvulsant? *Pharmacol Rep*. 2014 Aug;66(4):521–8.
- Beamer E, Lacey A, Alves M, Conte G, Tian F, de Diego-Garcia L, et al. Elevated blood purine levels as a biomarker of seizures and epilepsy. *Epilepsia*. 2021 Mar;62(3):817–28.
- Beaudeux J-L. *Biochimie medicale : marqueurs actuels et perspectives* (2e edition). 2011;36.
- Beaudeux J-L, Laribi S. [S100B protein serum level as a biomarker of minor head injury]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2013 Nov;71:71–8.
- Beniczky S, Hirsch LJ, Kaplan PW, Pressler R, Bauer G, Aurlien H, et al. Unified EEG terminology and criteria for nonconvulsive status epilepticus. *Epilepsia*. 2013 Sep;54 Suppl 6:28–9.
- Beretta S, Coppo A, Bianchi E, Zanchi C, Carone D, Stabile A, et al. Neurologic outcome of postanoxic refractory status epilepticus after aggressive treatment. *Neurology*. 2018 Dec 4;91(23):e2153–62.
- Betjemann JP, Lowenstein DH. Status epilepticus in adults. *Lancet Neurol*. 2015 Jun;14(6):615–24.
- Bialer M, Johannessen SI, Koepp MJ, Levy RH, Perucca E, Tomson T, et al. Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Fourteenth Eilat Conference on New Antiepileptic Drugs and Devices (EILAT XIV). I. Drugs in preclinical and early clinical development. *Epilepsia*. 2018 Oct;59(10):1811–41.
- Biberthaler P, Linsenmeier U, Pfeifer K-J, Kroetz M, Mussack T, Kanz K-G, et al. Serum S-100B concentration provides additional information for the indication of computed tomography in patients after minor head injury: a prospective multicenter study. *Shock*. 2006 May;25(5):446–53.
- Björkhem I, Lütjohann D, Diczfalusy U, Ståhle L, Ahlborg G, Wahren J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res*. 1998 Aug;39(8):1594–600.
- Björkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 May;24(5):806–15.

- Bösel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms U, Djoufack PC, et al. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem*. 2005 Mar;92(6):1386–98.
- Boudah S, Olivier M-F, Aros-Calt S, Oliveira L, Fenaille F, Tabet J-C, et al. Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014 Sep 1;966:34–47.
- Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1999 Mar;89(3):717–29.
- Boussicault L, Alves S, Lamazière A, Planques A, Heck N, Moumné L, et al. CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain*. 2016 Mar;139(Pt 3):953–70.
- Boussicault L, Kacher R, Lamazière A, Vanhoutte P, Caboche J, Betuing S, et al. CYP46A1 protects against NMDA-mediated excitotoxicity in Huntington's disease: Analysis of lipid raft content. *Biochimie*. 2018 Oct;153:70–9.
- Bretillon L, Lütjohann D, Stähle L, Widhe T, Bindl L, Eggertsen G, et al. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. *J Lipid Res*. 2000 May;41(5):840–5.
- Brigo F, Bragazzi NL, Bacigaluppi S, Nardone R, Trinka E. Is intravenous lorazepam really more effective and safe than intravenous diazepam as first-line treatment for convulsive status epilepticus? A systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials. *Epilepsy Behav*. 2016 Nov;64(Pt A):29–36.
- Broekaart DWM, Anink JJ, Baayen JC, Idema S, de Vries HE, Aronica E, et al. Activation of the innate immune system is evident throughout epileptogenesis and is associated with blood-brain barrier dysfunction and seizure progression. *Epilepsia*. 2018 Oct;59(10):1931–44.
- Bruno A, Shah N, Lin C, Close B, Hess DC, Davis K, et al. Improving modified Rankin Scale assessment with a simplified questionnaire. *Stroke*. 2010 May;41(5):1048–50.
- Buclin T, Biollaz J. [The blood-brain barrier: recent insights]. *Rev Med Suisse*. 2005 Apr 6;1(14):959–63.
- Burlot M-A, Braudeau J, Michaelsen-Preusse K, Potier B, Ayciriex S, Varin J, et al. Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology. *Hum Mol Genet*. 2015 Nov 1;24(21):5965–76.
- Burman RJ, Raimondo JV, Jefferys JGR, Sen A, Akerman CJ. The transition to status epilepticus: how the brain meets the demands of perpetual seizure activity. *Seizure*. 2020 Feb;75:137–44.

- Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold K-H, Haass C, et al. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science*. 2008 Sep 19;321(5896):1686–9.
- Calabrese VP, Gruemer HD, James K, Hranowsky N, DeLorenzo RJ. Cerebrospinal fluid lactate levels and prognosis in status epilepticus. *Epilepsia*. 1991 Dec;32(6):816–21.
- Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Nov;291(5):C1082-1088.
- Cantarín-Extremera V, Jiménez-Legido M, Duat-Rodríguez A, García-Fernández M, Ortiz-Cabrera NV, Ruiz-Falcó-Rojas ML, et al. Tocilizumab in pediatric refractory status epilepticus and acute epilepsy: Experience in two patients. *J Neuroimmunol*. 2020 Mar 15;340:577142.
- Carrera E, Claassen J, Oddo M, Emerson RG, Mayer SA, Hirsch LJ. Continuous electroencephalographic monitoring in critically ill patients with central nervous system infections. *Arch Neurol*. 2008 Dec;65(12):1612–8.
- Cattaneo S, Verlengia G, Marino P, Simonato M, Bettegazzi B. NPY and Gene Therapy for Epilepsy: How, When,... and Y. *Front Mol Neurosci*. 2020;13:608001.
- Chali F, Djelti F, Eugene E, Valderrama M, Marquer C, Aubourg P, et al. Inhibiting cholesterol degradation induces neuronal sclerosis and epileptic activity in mouse hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2015 May;41(10):1345–55.
- Chali F, Milior G, Marty S, Morin-Brureau M, Le Duigou C, Savary E, et al. Lipid markers and related transcripts during excitotoxic neurodegeneration in kainate-treated mice. *Eur J Neurosci*. 2019 Feb 14;
- Chamberlain JM, Kapur J, Shinnar S, Elm J, Holsti M, Babcock L, et al. Efficacy of levetiracetam, fosphenytoin, and valproate for established status epilepticus by age group (ESETT): a double-blind, responsive-adaptive, randomised controlled trial. *The Lancet*. 2020 Apr 11;395(10231):1217–24.
- Chaudhry F, Hunt RJ, Hariharan P, Anand SK, Sanjay S, Kjoller EE, et al. Machine Learning Applications in the Neuro ICU: A Solution to Big Data Mayhem? *Front Neurol*. 2020;11:554633.
- Chen JWY, Wasterlain CG. Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *Lancet Neurol*. 2006 Mar;5(3):246–56.
- Chiewthanakul P, Noppaklao P, Sawanyawisuth K, Tiamkao S. Factors associated with poor discharge status in patients with status epilepticus at Khon Kaen Hospital. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015;11:1097–101.
- Chou SH-Y, Macdonald RL, Keller E, Unruptured Intracranial Aneurysms and SAH CDE Project Investigators. Biospecimens and Molecular and Cellular Biomarkers in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Studies: Common Data Elements and Standard Reporting Recommendations. *Neurocrit Care*. 2019;30(Suppl 1):46–59.

- Chou SH-Y, Robertson CS, Participants in the International Multi-disciplinary Consensus Conference on the Multimodality Monitoring. Monitoring biomarkers of cellular injury and death in acute brain injury. *Neurocrit Care*. 2014 Dec;21 Suppl 2:S187-214.
- Ciurans J, Grau-López L, Jiménez M, Fumanal A, Misis M, Becerra JL. Refractory status epilepticus: Impact of baseline comorbidity and usefulness of STESS and EMSE scoring systems in predicting mortality and functional outcome. *Seizure*. 2018 Mar;56:98–103.
- Claassen J, Doyle K, Matory A, Couch C, Burger KM, Velazquez A, et al. Detection of Brain Activation in Unresponsive Patients with Acute Brain Injury. *N Engl J Med*. 2019 Jun 27;380(26):2497–505.
- Claassen J, Jetté N, Chum F, Green R, Schmidt M, Choi H, et al. Electrographic seizures and periodic discharges after intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2007 Sep 25;69(13):1356–65.
- Claassen J, Mayer SA, Kowalski RG, Emerson RG, Hirsch LJ. Detection of electrographic seizures with continuous EEG monitoring in critically ill patients. *Neurology*. 2004 May 25;62(10):1743–8.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1981 Aug;22(4):489–501.
- Commission on Epidemiology and Prognosis, International League Against Epilepsy. Guidelines for Epidemiologic Studies on Epilepsy. *Epilepsia*. 1993;34(4):592–6.
- Correale J, Rabinowicz AL, Heck CN, Smith TD, Loskota WJ, DeGiorgio CM. Status epilepticus increases CSF levels of neuron-specific enolase and alters the blood-brain barrier. *Neurology*. 1998 May;50(5):1388–91.
- Corsellis JA, Bruton CJ. Neuropathology of status epilepticus in humans. *Adv Neurol*. 1983;34:129–39.
- DeGiorgio CM, Correale JD, Gott PS, Ginsburg DL, Bracht KA, Smith T, et al. Serum neuron-specific enolase in human status epilepticus. *Neurology*. 1995 Jun;45(6):1134–7.
- DeGiorgio CM, Gott PS, Rabinowicz AL, Heck CN, Smith TD, Correale JD. Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus. *Epilepsia*. 1996 Jul;37(7):606–9.
- DeGiorgio CM, Heck CN, Rabinowicz AL, Gott PS, Smith T, Correale J. Serum neuron-specific enolase in the major subtypes of status epilepticus. *Neurology*. 1999 Mar 10;52(4):746–9.
- Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res*. 2004 Aug;45(8):1375–97.

- Dilena R, Mauri E, Aronica E, Bernasconi P, Bana C, Cappelletti C, et al. Therapeutic effect of Anakinra in the relapsing chronic phase of febrile infection-related epilepsy syndrome. *Epilepsia Open*. 2019 Jun;4(2):344–50.
- Djelti F, Braudeau J, Hudry E, Dhenain M, Varin J, Bièche I, et al. CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain*. 2015 Aug;138(Pt 8):2383–98.
- Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001 Jul;33(7):637–68.
- Engrand N, Crespel A. Pathophysiologic basis of status epilepticus. *Réanimation*. 2009;(18):21–5.
- Etminan M, Samii A, Brophy JM. Statin use and risk of epilepsy: a nested case-control study. *Neurology*. 2010 Oct 26;75(17):1496–500.
- Fauvelle F, Dorandeu F, Carpentier P, Foquin A, Rabeson H, Graveron-Demilly D, et al. Changes in mouse brain metabolism following a convulsive dose of soman: a proton HRMAS NMR study. *Toxicology*. 2010 Jan 12;267(1–3):99–111.
- FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016 [cited 2021 Jun 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>
- Fluss R, Faraggi D, Reiser B. Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point. *Biom J*. 2005 Aug;47(4):458–72.
- Folbergrová J, Ješina P, Kubová H, Druga R, Otáhal J. Status Epilepticus in Immature Rats Is Associated with Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:136.
- Foreman B, Claassen J, Abou Khaled K, Jirsch J, Alschuler DM, Wittman J, et al. Generalized periodic discharges in the critically ill: a case-control study of 200 patients. *Neurology*. 2012 Nov 6;79(19):1951–60.
- Freund Y, Bloom B, Bokobza J, Baarir N, Laribi S, Harris T, et al. Predictive value of S100-B and copeptin for outcomes following seizure: the BISTRO International Cohort Study. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0122405.
- Frigerio F, Frasca A, Weissberg I, Parrella S, Friedman A, Vezzani A, et al. Long-lasting pro-ictogenic effects induced in vivo by rat brain exposure to serum albumin in the absence of concomitant pathology. *Epilepsia*. 2012;53(11):1887–97.
- Gao Q, Ou-Yang T, Sun X, Yang F, Wu C, Kang T, et al. Prediction of functional outcome in patients with convulsive status epilepticus: the END-IT score. *Crit Care*. 2016 Feb 25;20:46.
- Gaspard N, Foreman BP, Alvarez V, Cabrera Kang C, Probasco JC, Jongeling AC, et al. New-onset refractory status epilepticus: Etiology, clinical features, and outcome. *Neurology*. 2015 Nov 3;85(18):1604–13.

- Gaspard N, Hirsch LJ, Sculier C, Loddenkemper T, van Baalen A, Lancrenon J, et al. New-onset refractory status epilepticus (NORSE) and febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES): State of the art and perspectives. *Epilepsia*. 2018 Apr;59(4):745–52.
- Gastaut H. Clinical and Electroencephalographical Classification of Epileptic Seizures. *Epilepsia*. 1970;11(1):102–12.
- Gastaut H. Status epilepticus. Mechanisms of brain damage and treatment. *Adv Neurol*. 1983;34:1–551.
- Giacomoni F, Le Corguillé G, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Pétéra M, et al. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics*. 2015 May 1;31(9):1493–5.
- Giovannini G, Monti G, Tondelli M, Marudi A, Valzania F, Leitinger M, et al. Mortality, morbidity and refractoriness prediction in status epilepticus: Comparison of STESS and EMSE scores. *Seizure*. 2017 Mar;46:31–7.
- Gnanapavan S, Hegen H, Khalil M, Hemmer B, Franciotta D, Hughes S, et al. Guidelines for uniform reporting of body fluid biomarker studies in neurologic disorders. *Neurology*. 2014 Sep 23;83(13):1210–6.
- González-Cuevas M, Santamarina E, Toledo M, Quintana M, Sala J, Sueiras M, et al. A new clinical score for the prognosis of status epilepticus in adults. *Eur J Neurol*. 2016 Oct;23(10):1534–40.
- Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E. Status epilepticus, blood–brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. *Epilepsy & Behavior*. 2015 Aug;49:13–6.
- Gouveia TLF, Scorza FA, Iha HA, Frangiotti MIB, Perosa SR, Cavalheiro EA, et al. Lovastatin decreases the synthesis of inflammatory mediators during epileptogenesis in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine-induced epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2014 Jul;36:68–73.
- Gouveia TLF, Scorza FA, Silva MJV, Bandeira T de A, Perosa SR, Argañaraz GA, et al. Lovastatin decreases the synthesis of inflammatory mediators in the hippocampus and blocks the hyperthermia of rats submitted to long-lasting status epilepticus. *Epilepsy Behav*. 2011 Jan;20(1):1–5.
- Gröticke I, Hoffmann K, Löscher W. Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate. *Exp Neurol*. 2008 Sep;213(1):71–83.
- Güiza F, Depreitere B, Piper I, Van den Berghe G, Meyfroidt G. Novel methods to predict increased intracranial pressure during intensive care and long-term neurologic outcome after traumatic brain injury: development and validation in a multicenter dataset. *Crit Care Med*. 2013 Feb;41(2):554–64.
- Gunawardane RN, Fordstrom P, Piper DE, Masterman S, Siu S, Liu D, et al. Agonistic Human Antibodies Binding to Lecithin-Cholesterol Acyltransferase Modulate High Density Lipoprotein Metabolism. *J Biol Chem*. 2016 Feb 5;291(6):2799–811.

- Güneş M, Büyükgöl H. Relationship between generalized epileptic seizure and neutrophil/lymphocyte ratio, platelet/lymphocyte ratio, and neutrophil mediated inflammation. *Int J Neurosci*. 2020 Nov;130(11):1095–100.
- Gurnett CA, Landt M, Wong M. Analysis of cerebrospinal fluid glial fibrillary acidic protein after seizures in children. *Epilepsia*. 2003 Nov;44(11):1455–8.
- Hanin A, Baudin P, Demeret S, Roussel D, Lecas S, Teyssou E, et al. Disturbances of brain cholesterol metabolism: A new excitotoxic process associated with status epilepticus. *Neurobiol Dis*. 2021 Mar 24;154:105346.
- Hanin A, Lambrecq V, Denis JA, Imbert-Bismut F, Rucheton B, Lamari F, et al. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of status epilepticus. *Epilepsia*. 2020 Jan;61(1):6–18.
- Heida JG, Pittman QJ. Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat. *Epilepsia*. 2005 Dec;46(12):1906–13.
- Helbok R, Beer R. Cerebrospinal fluid and brain extracellular fluid in severe brain trauma. *Handb Clin Neurol*. 2017;146:237–58.
- Henshall DC, Chen J, Simon RP. Involvement of Caspase-3-Like Protease in the Mechanism of Cell Death Following Focally Evoked Limbic Seizures. *Journal of Neurochemistry*. 2000;74(3):1215–23.
- Hering H, Lin C-C, Sheng M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci*. 2003 Apr 15;23(8):3262–71.
- Hernandes Rocha TA, Elahi C, Cristina da Silva N, Sakita FM, Fuller A, Mmbaga BT, et al. A traumatic brain injury prognostic model to support in-hospital triage in a low-income country: a machine learning-based approach. *J Neurosurg*. 2019 May 10;132(6):1961–9.
- Heverin M, Engel T, Meaney S, Jimenez-Mateos EM, Al-Saudi R, Henshall DC. Bi-lateral changes to hippocampal cholesterol levels during epileptogenesis and in chronic epilepsy following focal-onset status epilepticus in mice. *Brain Res*. 2012 Oct 22;1480:81–90.
- Hirsch LJ, Fong MWK, Leitinger M, LaRoche SM, Beniczky S, Abend NS, et al. American Clinical Neurophysiology Society’s Standardized Critical Care EEG Terminology: 2021 Version. *J Clin Neurophysiol*. 2021 Jan 1;38(1):1–29.
- Hirsch LJ, Gaspard N, van Baalen A, Nabbout R, Demeret S, Loddenkemper T, et al. Proposed consensus definitions for new-onset refractory status epilepticus (NORSE), febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES), and related conditions. *Epilepsia*. 2018;59(4):739–44.
- Ho C-J, Lin C-H, Lu Y-T, Shih F-Y, Hsu C-W, Tsai W-C, et al. Perampanel Treatment for Refractory Status Epilepticus in a Neurological Intensive Care Unit. *Neurocrit Care*. 2019 Aug;31(1):24–9.

- Holtkamp M, Othman J, Buchheim K, Masuhr F, Schielke E, Meierkord H. A “malignant” variant of status epilepticus. *Arch Neurol*. 2005 Sep;62(9):1428–31.
- Horák J, Cuparencu B, Cucuianu M, Opincaru A, Seusan E, Vincze I. Effects of some benzodiazepine derivatives on Triton WR-1339-Induced hyperlipidaemia in rats. *Atherosclerosis*. 1976 Aug;24(1–2):81–97.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1125–31.
- Horton JD, Shimomura I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol*. 1999 Apr;10(2):143–50.
- Huchtemann T, Körtvélyessy P, Feistner H, Heinze HJ, Bittner D. Progranulin levels in status epilepticus as a marker of neuronal recovery and neuroprotection. *Epilepsy & Behavior*. 2015 Aug;49:170–2.
- Hutson M. Artificial intelligence faces reproducibility crisis. *Science*. 2018 Feb 16;359(6377):725–6.
- Jaitly R, Sgro JA, Towne AR, Ko D, DeLorenzo RJ. Prognostic value of EEG monitoring after status epilepticus: a prospective adult study. *J Clin Neurophysiol*. 1997 Jul;14(4):326–34.
- Jiang Y, Cai M-Y, Yang Y, Geng J-H, Zhang Y, Zhang L-P, et al. Prediction of in-hospital mortality in status epilepticus: Evaluation of four scoring tools in younger and older adult patients. *Epilepsy Behav*. 2021 Jan;114(Pt A):107572.
- Johnson EL, Kaplan PW. Population of the ictal-interictal zone: The significance of periodic and rhythmic activity. *Clin Neurophysiol Pract*. 2017;2:107–18.
- Jun J-S, Lee S-T, Kim R, Chu K, Lee SK. Tocilizumab treatment for new onset refractory status epilepticus. *Ann Neurol*. 2018 Dec;84(6):940–5.
- Jutila L, Immonen A, Partanen K, Partanen J, Mervaala E, Ylinen A, et al. Neurobiology of epileptogenesis in the temporal lobe. *Adv Tech Stand Neurosurg*. 2002;27:5–22.
- Kalss G, Rohracher A, Leitinger M, Pilz G, Novak HF, Neuray C, et al. Intravenous brivaracetam in status epilepticus: A retrospective single-center study. *Epilepsia*. 2018 Oct;59 Suppl 2:228–33.
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jan 1;28(1):27–30.
- Kang BS, Kim DW, Kim KK, Moon HJ, Kim Y-S, Kim HK, et al. Prediction of mortality and functional outcome from status epilepticus and independent external validation of STESS and EMSE scores. *Crit Care*. 2016 Jan 27;20:25.
- Kantanen A-M, Reinikainen M, Parviainen I, Kälviäinen R. Long-term outcome of refractory status epilepticus in adults: A retrospective population-based study. *Epilepsy Res*. 2017 Jul;133:13–21.

- Kapur J, Elm J, Chamberlain JM, Barsan W, Cloyd J, Lowenstein D, et al. Randomized Trial of Three Anticonvulsant Medications for Status Epilepticus. *N Engl J Med*. 2019 28;381(22):2103–13.
- Karasinska JM, Rinninger F, Lütjohann D, Ruddle P, Franciosi S, Kruit JK, et al. Specific loss of brain ABCA1 increases brain cholesterol uptake and influences neuronal structure and function. *J Neurosci*. 2009 Mar 18;29(11):3579–89.
- Kenney-Jung DL, Vezzani A, Kahoud RJ, LaFrance-Corey RG, Ho M-L, Muskardin TW, et al. Febrile infection-related epilepsy syndrome treated with anakinra. *Ann Neurol*. 2016 Dec;80(6):939–45.
- Kim J-H, Jittiwat J, Ong W-Y, Farooqui AA, Jenner AM. Changes in cholesterol biosynthetic and transport pathways after excitotoxicity. *J Neurochem*. 2010 Jan;112(1):34–41.
- Kim YH, Shim HS, Kim KH, Lee J, Chung BC, Kowall NW, et al. Metabolomic Analysis Identifies Alterations of Amino Acid Metabolome Signatures in the Postmortem Brain of Alzheimer's Disease. *Exp Neurol*. 2019 Jun;28(3):376–89.
- Kleen JK, Holmes GL. Brain inflammation initiates seizures. *Nat Med*. 2008 Dec;14(12):1309–10.
- Kleen JK, Holmes GL. Taming TLR4 may ease seizures. *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):369–70.
- Klement W, Blaquiere M, Zub E, deBock F, Boux F, Barbier E, et al. A pericyte-glia scarring develops at the leaky capillaries in the hippocampus during seizure activity. *Epilepsia*. 2019 Jul;60(7):1399–411.
- Koren JP, Herta J, Fürbass F, Pirker S, Reiner-Deitemyer V, Riederer F, et al. Automated Long-Term EEG Review: Fast and Precise Analysis in Critical Care Patients. *Front Neurol*. 2018;9:454.
- Korinek M, Vyklicky V, Borovska J, Lichnerova K, Kaniakova M, Krausova B, et al. Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors. *J Physiol (Lond)*. 2015 May 15;593(10):2279–93.
- Körner A, Zhou E, Müller C, Mohammed Y, Herceg S, Bracher F, et al. Inhibition of Δ^24 -dehydrocholesterol reductase activates pro-resolving lipid mediator biosynthesis and inflammation resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Oct 8;116(41):20623–34.
- Koschack J, Lütjohann D, Schmidt-Samoa C, Irle E. Serum 24S-hydroxycholesterol and hippocampal size in middle-aged normal individuals. *Neurobiol Aging*. 2009 Jun;30(6):898–902.
- Kothur K, Bhandodkar S, Wienholt L, Chu S, Pope A, Gill D, et al. Etiology is the key determinant of neuroinflammation in epilepsy: Elevation of cerebrospinal fluid cytokines and chemokines in febrile infection-related epilepsy syndrome and febrile status epilepticus. *Epilepsia*. 2019 Aug;60(8):1678–88.
- Kramer U, Chi C-S, Lin K-L, Specchio N, Sahin M, Olson H, et al. Febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES): pathogenesis, treatment, and outcome: a multicenter study on 77 children. *Epilepsia*. 2011 Nov;52(11):1956–65.

- Kugler W, Erdlenbruch B, Jünemann A, Heinemann D, Eibl H, Lakomek M. Erucylphosphocholine-induced apoptosis in glioma cells: involvement of death receptor signalling and caspase activation. *J Neurochem.* 2002 Sep;82(5):1160–70.
- Le Duigou C, Bouilleret V, Miles R. Epileptiform activities in slices of hippocampus from mice after intra-hippocampal injection of kainic acid. *J Physiol (Lond).* 2008 Oct 15;586(20):4891–904.
- Le Gal La Salle G. Long-lasting and sequential increase of c-fos oncoprotein expression in kainic acid-induced status epilepticus. *Neurosci Lett.* 1988 May 26;88(2):127–30.
- Lee J-K, Won J-S, Singh AK, Singh I. Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death. *Neurosci Lett.* 2008 Aug 8;440(3):260–4.
- Lehtimäki KA, Keränen T, Huhtala H, Hurme M, Ollikainen J, Honkaniemi J, et al. Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid and serum compartments by seizures: the effect of seizure type and duration. *J Neuroimmunol.* 2004 Jul;152(1–2):121–5.
- Lehtimäki KA, Keränen T, Palmio J, Mäkinen R, Hurme M, Honkaniemi J, et al. Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica.* 2007 Oct;116(4):226–30.
- Lehtimäki KA, Keränen T, Palmio J, Peltola J. Levels of IL-1 β and IL-1ra in Cerebrospinal Fluid of Human Patients after Single and Prolonged Seizures. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17(1):19–22.
- Lehtimäki KA, Peltola J, Koskikallio E, Keränen T, Honkaniemi J. Expression of cytokines and cytokine receptors in the rat brain after kainic acid-induced seizures. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Feb 20;110(2):253–60.
- Leitinger M, Beniczky S, Rohracher A, Gardella E, Kalss G, Qerama E, et al. Salzburg Consensus Criteria for Non-Convulsive Status Epilepticus—approach to clinical application. *Epilepsy Behav.* 2015a Aug;49:158–63.
- Leitinger M, Höller Y, Kalss G, Rohracher A, Novak HF, Höfler J, et al. Epidemiology-based mortality score in status epilepticus (EMSE). *Neurocrit Care.* 2015b Apr;22(2):273–82.
- Leitinger M, Trinka E, Gardella E, Rohracher A, Kalss G, Qerama E, et al. Diagnostic accuracy of the Salzburg EEG criteria for non-convulsive status epilepticus: a retrospective study. *Lancet Neurol.* 2016 Sep;15(10):1054–62.
- Leitinger M, Trinka E, Giovannini G, Zimmermann G, Florea C, Rohracher A, et al. Epidemiology of status epilepticus in adults: A population-based study on incidence, causes, and outcomes. *Epilepsia.* 2019 Jan;60(1):53–62.
- Lenzer-Fanara JR, Li T, Salerni EA, Payen F, Croll SD. VEGF treatment during status epilepticus attenuates long-term seizure-associated alterations in astrocyte morphology. *Epilepsy Behav.* 2017;70(Pt A):33–44.
- Leoni V, Caccia C. 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. *Biochimie.* 2013 Mar;95(3):595–612.

- Levitan I, Singh DK, Rosenhouse-Dantsker A. Cholesterol binding to ion channels. *Front Physiol.* 2014;5:65.
- Li H-T, Wu T, Lin W-R, Tseng W-EJ, Chang C-W, Cheng M-Y, et al. Clinical correlation and prognostic implication of periodic EEG patterns: A cohort study. *Epilepsy Res.* 2017;131:44–50.
- Li Y-J, Wang Z-H, Zhang B, Zhe X, Wang M-J, Shi S-T, et al. Disruption of the blood-brain barrier after generalized tonic-clonic seizures correlates with cerebrospinal fluid MMP-9 levels. *J Neuroinflammation.* 2013 Jul 5;10:80.
- Lim S-N, Wu T, Tseng W-EJ, Chiang H-I, Cheng M-Y, Lin W-R, et al. Efficacy and safety of perampanel in refractory and super-refractory status epilepticus: cohort study of 81 patients and literature review. *J Neurol.* 2021 Mar 22;
- Limotai C, Ingsathit A, Thadanipon K, McEvoy M, Attia J, Thakkinstian A. How and Whom to Monitor for Seizures in an ICU: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Care Med.* 2019;47(4):e366–73.
- Lowenstein DH, Bleck T, Macdonald RL. It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia.* 1999 Jan;40(1):120–2.
- Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 Jun 22;96(13):7238–43.
- Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Sidén A, Diczfalusy U, et al. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Sep 3;93(18):9799–804.
- Lv R-J, Wang Q, Cui T, Zhu F, Shao X-Q. Status epilepticus-related etiology, incidence and mortality: A meta-analysis. *Epilepsy Res.* 2017 Oct;136:12–7.
- Madžar D, Geyer A, Knappe RU, Gollwitzer S, Kuramatsu JB, Gerner ST, et al. Association of seizure duration and outcome in refractory status epilepticus. *J Neurol.* 2016 Mar;263(3):485–91.
- Marawar R, Basha M, Mahulikar A, Desai A, Suchdev K, Shah A. Updates in Refractory Status Epilepticus. *Crit Care Res Pract.* 2018;2018:9768949.
- Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, Iyer AM, et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med.* 2010 Apr;16(4):413–9.
- Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature.* 2005 Dec 1;438(7068):612–21.
- McMullan J, Sasson C, Pancioli A, Silbergleit R. Midazolam versus diazepam for the treatment of status epilepticus in children and young adults: a meta-analysis. *Acad Emerg Med.* 2010 Jun;17(6):575–82.

- Meguid NA, Samir H, Bjørklund G, Anwar M, Hashish A, Koura F, et al. Altered S100 Calcium-Binding Protein B and Matrix Metalloproteinase 9 as Biomarkers of Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampus Sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2018 Dec;66(4):482–91.
- Meyer A-C, Dua T, Ma J, Saxena S, Birbeck G. Global disparities in the epilepsy treatment gap: a systematic review. *Bull World Health Organ*. 2010 Apr;88(4):260–6.
- Mezouar N, Demeret S, Rotge JY, Dupont S, Navarro V. Psychogenic non epileptic seizure-status in patients admitted in intensive care unit. *Eur J Neurol*. 2021 May 25;
- Milagre I, Nunes MJ, Gama MJ, Silva RF, Pascussi JM, Lechner MC, et al. Transcriptional regulation of the human CYP46A1 brain-specific expression by Sp transcription factors. *J Neurochem*. 2008 Jul;106(2):835–49.
- Miljanovic N, van Dijk RM, Buchecker V, Potschka H. Metabolomic signature of the Dravet syndrome: A genetic mouse model study. *Epilepsia*. 2021 Jul 5;
- Mitsche MA, McDonald JG, Hobbs HH, Cohen JC. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife*. 2015 Jun 26;4:e07999.
- Moalong KMC, Espiritu AI, Fernandez MLL. Efficacy and tolerability of intravenous brivaracetam for status epilepticus: A systematic review. *J Neurol Sci*. 2020 Jun 15;413:116799.
- Moffet EW, Subramaniam T, Hirsch LJ, Gilmore EJ, Lee JW, Rodriguez-Ruiz AA, et al. Validation of the 2HELPS2B Seizure Risk Score in Acute Brain Injury Patients. *Neurocrit Care*. 2020 Dec;33(3):701–7.
- Moncada S, Bolaños JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem*. 2006 Jun;97(6):1676–89.
- Monti G, Tondelli M, Giovannini G, Bedin R, Nichelli PF, Trenti T, et al. Cerebrospinal fluid tau proteins in status epilepticus. *Epilepsy Behav*. 2015 Aug;49:150–4.
- Mori T, Paris D, Town T, Rojiani AM, Sparks DL, Delledonne A, et al. Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001 Aug;60(8):778–85.
- Motti D, Le Duigou C, Eugène E, Chemaly N, Wittner L, Lazarevic D, et al. Gene expression analysis of the emergence of epileptiform activity after focal injection of kainic acid into mouse hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2010 Oct;32(8):1364–79.
- Mundlamuri RC, Sinha S, Subbakrishna DK, Prathyusha PV, Nagappa M, Bindu PS, et al. Management of generalised convulsive status epilepticus (SE): A prospective randomised controlled study of combined treatment with intravenous lorazepam with either phenytoin, sodium valproate or levetiracetam--Pilot study. *Epilepsy Res*. 2015 Aug;114:52–8.

- Nabbout R, Mazzuca M, Hubert P, Peudennier S, Allaire C, Flurin V, et al. Efficacy of ketogenic diet in severe refractory status epilepticus initiating fever induced refractory epileptic encephalopathy in school age children (FIRES). *Epilepsia*. 2010 Oct;51(10):2033–7.
- Navarro V, Dagrón C, Elie C, Lamhaut L, Demeret S, Urien S, et al. Prehospital treatment with levetiracetam plus clonazepam or placebo plus clonazepam in status epilepticus (SAMUKeppra): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2016 Jan;15(1):47–55.
- Naylor DE, Liu H, Wasterlain CG. Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *J Neurosci*. 2005 Aug 24;25(34):7724–33.
- Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*. 2001 Oct;11(10):406–12.
- Niquet J, Baldwin R, Suchomelova L, Lumley L, Naylor D, Eavey R, et al. Benzodiazepine-refractory status epilepticus: pathophysiology and principles of treatment. *Ann N Y Acad Sci*. 2016 Aug;1378(1):166–73.
- Noguchi N, Saito Y, Urano Y. Diverse functions of 24(S)-hydroxycholesterol in the brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Apr 11;446(3):692–6.
- Noguchi N, Urano Y, Takabe W, Saito Y. New aspects of 24(S)-hydroxycholesterol in modulating neuronal cell death. *Free Radic Biol Med*. 2015 Oct;87:366–72.
- Norum KR, Remaley AT, Miettinen HE, Strøm EH, Balbo BEP, Sampaio CAT. L, et al. Lecithin:cholesterol acyltransferase: symposium on 50 years of biomedical research from its discovery to latest findings. *J Lipid Res*. 2020 Aug;61(8):1142–9.
- Ochoa JG, Dougherty M, Papanastassiou A, Gidal B, Mohamed I, Vossler DG. Treatment of Super-Refractory Status Epilepticus: A Review. *Epilepsy Curr*. 2021 Mar 10;1535759721999670.
- Oliveira CV de, Grigoletto J, Canzian JM, Duarte MMMF, Duarte T, Furian AF, et al. Effect of atorvastatin on behavioral alterations and neuroinflammation during epileptogenesis. *Epilepsy Behav*. 2018 Jan;78:109–17.
- Omar AS, Hanoura S, Al-Janubi HM, Mahfouz A. Statins in critical care: to give or not to give? *Minerva Anesthesiol*. 2017 May;83(5):502–11.
- Ong W-Y, Kim J-H, He X, Chen P, Farooqui AA, Jenner AM. Changes in brain cholesterol metabolome after excitotoxicity. *Mol Neurobiol*. 2010 Jun;41(2–3):299–313.
- Orta DSJ, Chiappa KH, Quiroz AZ, Costello DJ, Cole AJ. Prognostic implications of periodic epileptiform discharges. *Arch Neurol*. 2009 Aug;66(8):985–91.

- Outin H, Guèye P, Alvarez V, Auvin S, Clair B, Convers P, et al. Prise en charge des états de mal épileptiques en préhospitalier, en structure d'urgence et en réanimation dans les 48 premières heures (à l'exclusion du nouveau-né et du nourrisson). *Méd Intensive Réa* [Internet]. 2020 Jul 30 [cited 2021 Apr 18]; Available from: <https://revue-mir.srlf.org/index.php/mir/article/view/85>
- Pacha MS, Orellana L, Silva E, Ernst G, Pantiu F, Quiroga Narvaez J, et al. Role of EMSE and STESS scores in the outcome evaluation of status epilepticus. *Epilepsy Behav.* 2016;64(Pt A):140–2.
- Palmio J, Keränen T, Alapirtti T, Hulkkonen J, Mäkinen R, Holm P, et al. Elevated serum neuron-specific enolase in patients with temporal lobe epilepsy: a video-EEG study. *Epilepsy Res.* 2008 Oct;81(2–3):155–60.
- Palmio J, Suhonen J, Keränen T, Hulkkonen J, Peltola J, Pirttilä T. Cerebrospinal fluid tau as a marker of neuronal damage after epileptic seizure. *Seizure.* 2009 Sep;18(7):474–7.
- Palop JJ, Mucke L. Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2009 Apr;66(4):435–40.
- Pappalardo JL, Zhang L, Pecsok MK, Perlman K, Zografou C, Raddassi K, et al. Transcriptomic and clonal characterization of T cells in the human central nervous system. *Sci Immunol.* 2020 Sep 18;5(51).
- Park EG, Lee J, Lee J. The ketogenic diet for super-refractory status epilepticus patients in intensive care units. *Brain Dev.* 2019 May;41(5):420–7.
- Parvareshi Hamrah M, Rezaei Tavirani M, Movahedi M, Ahmadi Karvigh S. Identification of Serum Biomarkers for Differentiating Epileptic Seizures from Psychogenic Attacks Using a Proteomic Approach; a Comparative study. *Arch Acad Emerg Med.* 2020;8(1):e87.
- Paul SM, Doherty JJ, Robichaud AJ, Belfort GM, Chow BY, Hammond RS, et al. The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurosci.* 2013 Oct 30;33(44):17290–300.
- Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods.* 1985 Apr;13(2):139–43.
- Payne ET, Zhao XY, Frndova H, McBain K, Sharma R, Hutchison JS, et al. Seizure burden is independently associated with short term outcome in critically ill children. *Brain.* 2014 May;137(Pt 5):1429–38.
- Pfrieger FW. Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays.* 2003 Jan;25(1):72–8.
- Pichler M, Hocker S. Management of status epilepticus. *Handb Clin Neurol.* 2017;140:131–51.
- Pokharel SM, Shil NK, Gc JB, Colburn ZT, Tsai S-Y, Segovia JA, et al. Integrin activation by the lipid molecule 25-hydroxycholesterol induces a proinflammatory response. *Nat Commun.* 2019 01;10(1):1482.

- Ponce J, de la Ossa NP, Hurtado O, Millan M, Arenillas JF, Dávalos A, et al. Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke*. 2008 Apr;39(4):1269–75.
- Prasad M, Krishnan PR, Sequeira R, Al-Roomi K. Anticonvulsant therapy for status epilepticus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Sep 10;(9):CD003723.
- Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Progress in Lipid Research*. 2006 Jul 1;45(4):295–333.
- Pugh MJV, Knoefel JE, Mortensen EM, Amuan ME, Berlowitz DR, Van Cott AC. New-onset epilepsy risk factors in older veterans. *J Am Geriatr Soc*. 2009 Feb;57(2):237–42.
- Quintana-Pájaro LDJ, Ramos-Villegas Y, Cortecero-Sabalza E, Joaquim AF, Agrawal A, Narvaez-Rojas AR, et al. The Effect of Statins in Epilepsy: A Systematic Review. *J Neurosci Rural Pract*. 2018 Dec;9(4):478–86.
- Rabinowicz AL, Correale J, Boutros RB, Couldwell WT, Henderson CW, DeGiorgio CM. Neuron-specific enolase is increased after single seizures during inpatient video/EEG monitoring. *Epilepsia*. 1996 Feb;37(2):122–5.
- Rabinowicz AL, Correale JD, Bracht KA, Smith TD, DeGiorgio CM. Neuron-specific enolase is increased after nonconvulsive status epilepticus. *Epilepsia*. 1995 May;36(5):475–9.
- Raj R, Luostarinen T, Pursiainen E, Posti JP, Takala RSK, Bendel S, et al. Machine learning-based dynamic mortality prediction after traumatic brain injury. *Sci Rep*. 2019 Nov 27;9(1):17672.
- Ramirez C, Tercero I, Pineda A, Burgos JS. Simvastatin is the statin that most efficiently protects against kainate-induced excitotoxicity and memory impairment. *J Alzheimers Dis*. 2011;24(1):161–74.
- Ramirez DMO, Andersson S, Russell DW. Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 2008 Apr 10;507(5):1676–93.
- Ramont L, Thoannes H, Volondat A, Chastang F, Millet M-C, Maquart F-X. Effects of hemolysis and storage condition on neuron-specific enolase (NSE) in cerebrospinal fluid and serum: implications in clinical practice. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(11):1215–7.
- Rana A, Musto AE. The role of inflammation in the development of epilepsy. *J Neuroinflammation*. 2018 May 15;15(1):144.
- Rangel P, Cysneiros RM, Arida RM, de Albuquerque M, Colugnati DB, Scorza CA, et al. Lovastatin reduces neuronal cell death in hippocampal CA1 subfield after pilocarpine-induced status epilepticus: preliminary results. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005 Dec;63(4):972–6.
- Reindl C, Knappe RU, Sprügel MI, Sembill JA, Mueller TM, Hamer HM, et al. Comparison of scoring tools for the prediction of in-hospital mortality in status epilepticus. *Seizure*. 2018 Mar;56:92–7.

- Rejdak K, Kuhle J, Rüegg S, Lindberg RLP, Petzold A, Sulejczak D, et al. Neurofilament heavy chain and heat shock protein 70 as markers of seizure-related brain injury. *Epilepsia*. 2012 May;53(5):922–7.
- Ribeiro A, Singh R, Brunnhuber F. Clinical outcome of generalized periodic epileptiform discharges on first EEG in patients with hypoxic encephalopathy postcardiac arrest. *Epilepsy Behav*. 2015 Aug;49:268–72.
- Rodriguez Ruiz A, Vlachy J, Lee JW, Gilmore EJ, Ayer T, Haider HA, et al. Association of Periodic and Rhythmic Electroencephalographic Patterns With Seizures in Critically Ill Patients. *JAMA Neurol*. 2017 Feb 1;74(2):181–8.
- Rohaut B, Doyle KW, Reynolds AS, Igwe K, Couch C, Matory A, et al. Deep structural brain lesions associated with consciousness impairment early after hemorrhagic stroke. *Sci Rep*. 2019 Mar 12;9(1):4174.
- Rohracher A, Höfler J, Kalss G, Leitinger M, Kuchukhidze G, Deak I, et al. Perampanel in patients with refractory and super-refractory status epilepticus in a neurological intensive care unit. *Epilepsy Behav*. 2015 Aug;49:354–8.
- Rohracher A, Kalss G, Neuray C, Höfler J, Dobesberger J, Kuchukhidze G, et al. Perampanel in patients with refractory and super-refractory status epilepticus in a neurological intensive care unit: A single-center audit of 30 patients. *Epilepsia*. 2018 Oct;59 Suppl 2:234–42.
- Rossetti AO, Alvarez V, Januel J-M, Burnand B. Treatment deviating from guidelines does not influence status epilepticus prognosis. *J Neurol*. 2013 Feb;260(2):421–8.
- Rossetti AO, Logroscino G, Bromfield EB. A clinical score for prognosis of status epilepticus in adults. *Neurology*. 2006 Jun 13;66(11):1736–8.
- Rossetti AO, Logroscino G, Milligan TA, Michaelides C, Ruffieux C, Bromfield EB. Status Epilepticus Severity Score (STESS): a tool to orient early treatment strategy. *J Neurol*. 2008 Oct;255(10):1561–6.
- Rossetti AO, Lowenstein DH. Management of refractory status epilepticus in adults: still more questions than answers. *Lancet Neurol*. 2011 Oct;10(10):922–30.
- Royds JA, Davies-Jones GA, Lewtas NA, Timperley WR, Taylor CB. Enolase isoenzymes in the cerebrospinal fluid of patients with diseases of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1983 Nov;46(11):1031–6.
- Ruskin DN, Kawamura M, Masino SA. Reduced pain and inflammation in juvenile and adult rats fed a ketogenic diet. *PLoS One*. 2009 Dec 23;4(12):e8349.
- Saeed AA, Genové G, Li T, Hülshorst F, Betsholtz C, Björkhem I, et al. Increased flux of the plant sterols campesterol and sitosterol across a disrupted blood brain barrier. *Steroids*. 2015 Jul;99(Pt B):183–8.

- Sainju RK, Manganas LN, Gilmore EJ, Petroff OA, Rampal N, Hirsch LJ, et al. Clinical Correlates and Prognostic Significance of Lateralized Periodic Discharges in Patients Without Acute or Progressive Brain Injury: A Case-Control Study. *J Clin Neurophysiol*. 2015 Dec;32(6):495–500.
- Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H, et al. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 10;286(1):176–83.
- Sakuma H, Tanuma N, Kuki I, Takahashi Y, Shiomi M, Hayashi M. Intrathecal overproduction of proinflammatory cytokines and chemokines in febrile infection-related refractory status epilepticus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015 Jul;86(7):820–2.
- Samancı Y, Samancı B, Şahin E, Altıokka-Uzun G, Küçükali Cİ, Tüzün E, et al. Neuron-specific enolase levels as a marker for possible neuronal damage in idiopathic intracranial hypertension. *Acta Neurol Belg*. 2017 Sep;117(3):707–11.
- Sanchez-Peña P, Pereira A-R, Sourour N-A, Biondi A, Lejean L, Colonne C, et al. S100B as an additional prognostic marker in subarachnoid aneurysmal hemorrhage. *Crit Care Med*. 2008 Aug;36(8):2267–73.
- Sankar R, Shin DH, Wasterlain CG. Serum neuron-specific enolase is a marker for neuronal damage following status epilepticus in the rat. *Epilepsy Res*. 1997 Sep;28(2):129–36.
- Santamarina E, Parejo Carbonell B, Sala J, Gutiérrez-Viedma Á, Miró J, Asensio M, et al. Use of intravenous brivaracetam in status epilepticus: A multicenter registry. *Epilepsia*. 2019 Aug;60(8):1593–601.
- Sasaki M, Delawary M, Sakurai H, Kobayashi H, Nakao N, Tsuru H, et al. Novel LCAT (Lecithin:Cholesterol Acyltransferase) Activator DS-8190a Prevents the Progression of Plaque Accumulation in Atherosclerosis Models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 Jan;41(1):360–76.
- Sen J, Belli A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J Neurosci Res*. 2007 May 15;85(7):1373–80.
- Sévin DC, Kuehne A, Zamboni N, Sauer U. Biological insights through nontargeted metabolomics. *Curr Opin Biotechnol*. 2015 Aug;34:1–8.
- Shafi MM, Westover MB, Cole AJ, Kilbride RD, Hoch DB, Cash SS. Absence of early epileptiform abnormalities predicts lack of seizures on continuous EEG. *Neurology*. 2012 Oct 23;79(17):1796–801.
- Shamabadi A, Akhondzadeh S. Advances in Alternative and Integrative Medicine in the Treatment of Depression: A Review of the Evidence. *Arch Iran Med*. 2021 May 1;24(5):409–18.
- Sharpe C, Davis SL, Reiner GE, Lee LI, Gold JJ, Nespeca M, et al. Assessing the Feasibility of Providing a Real-Time Response to Seizures Detected With Continuous Long-Term Neonatal Electroencephalography Monitoring. *J Clin Neurophysiol*. 2019 Jan;36(1):9–13.

- Shi L-M, Chen R-J, Zhang H, Jiang C-M, Gong J. Cerebrospinal fluid neuron specific enolase, interleukin-1 β and erythropoietin concentrations in children after seizures. *Childs Nerv Syst.* 2017 May;33(5):805–11.
- Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 23;96(24):13656–61.
- Sierra S, Ramos MC, Molina P, Esteo C, Vázquez JA, Burgos JS. Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *J Alzheimers Dis.* 2011;23(2):307–18.
- Sierra-Marcos A, Alvarez V, Faouzi M, Burnand B, Rossetti AO. Statins are associated with decreased mortality risk after status epilepticus. *Eur J Neurol.* 2015 Feb;22(2):402–5.
- Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Nov 4;101(21):1446–52.
- Simonato M, Zucchini S. Are the neurotrophic factors a suitable therapeutic target for the prevention of epileptogenesis? *Epilepsia.* 2010 Jul;51 Suppl 3:48–51.
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):31–9.
- Smiljanic K, Lavrnja I, Mladenovic Djordjevic A, Ruzdijic S, Stojiljkovic M, Pekovic S, et al. Brain injury induces cholesterol 24-hydroxylase (Cyp46) expression in glial cells in a time-dependent manner. *Histochem Cell Biol.* 2010 Aug;134(2):159–69.
- Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit.* 2005 Dec;27(6):747–51.
- Sng JCG, Taniura H, Yoneda Y. A tale of early response genes. *Biol Pharm Bull.* 2004 May;27(5):606–12.
- Snodgrass SM, Tsuburaya K, Ajmone-Marsan C. Clinical significance of periodic lateralized epileptiform discharges: relationship with status epilepticus. *J Clin Neurophysiol.* 1989 Apr;6(2):159–72.
- Sodero AO, Vriens J, Ghosh D, Stegner D, Brachet A, Pallotto M, et al. Cholesterol loss during glutamate-mediated excitotoxicity. *EMBO J.* 2012 Apr 4;31(7):1764–73.
- Sokrab TE, Kalimo H, Johansson BB. Endogenous serum albumin content in brain after short-lasting epileptic seizures. *Brain Res.* 1989 Jun 12;489(2):231–6.
- Sonneville R, Mariotte E, Neuville M, Minaud S, Magalhaes E, Ruckly S, et al. Early-onset status epilepticus in patients with acute encephalitis. *Medicine (Baltimore).* 2016 Jul;95(30):e4092.
- Souidi M, Dubrac S, Parquet M, Volle DH, Lobaccaro J-MA, Mathé D, et al. [Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases]. *Gastroenterol Clin Biol.* 2004 Mar;28(3):279–93.

- Specchio N, Pietrafusa N. New-onset refractory status epilepticus and febrile infection-related epilepsy syndrome. *Dev Med Child Neurol*. 2020 Aug;62(8):897–905.
- Stapleton CJ, Acharjee A, Irvine HJ, Wolcott ZC, Patel AB, Kimberly WT. High-throughput metabolite profiling: identification of plasma taurine as a potential biomarker of functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2019 Nov 22;1–8.
- Stredny CM, Case S, Sansevere AJ, Son M, Henderson L, Gorman MP. Interleukin-6 Blockade With Tocilizumab in Anakinra-Refractory Febrile Infection-Related Epilepsy Syndrome (FIRES). *Child Neurol Open*. 2020 Dec;7:2329048X20979253.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 1;90(5):1977–81.
- Struck AF, Rodriguez-Ruiz AA, Osman G, Gilmore EJ, Haider HA, Dhakar MB, et al. Comparison of machine learning models for seizure prediction in hospitalized patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019 Jul;6(7):1239–47.
- Struck AF, Tabaeizadeh M, Schmitt SE, Ruiz AR, Swisher CB, Subramaniam T, et al. Assessment of the Validity of the 2HELPS2B Score for Inpatient Seizure Risk Prediction. *JAMA Neurol*. 2020 13;
- Struck AF, Ustun B, Ruiz AR, Lee JW, LaRoche SM, Hirsch LJ, et al. Association of an Electroencephalography-Based Risk Score With Seizure Probability in Hospitalized Patients. *JAMA Neurol*. 2017 01;74(12):1419–24.
- Strzelczyk A, Kay L, Bauer S, Immisch I, Klein KM, Knake S, et al. Use of brivaracetam in genetic generalized epilepsies and for acute, intravenous treatment of absence status epilepticus. *Epilepsia*. 2018 Aug;59(8):1549–56.
- Strzelczyk A, Knake S, Kälviäinen R, Santamarina E, Toledo M, Willig S, et al. Perampanel for treatment of status epilepticus in Austria, Finland, Germany, and Spain. *Acta Neurol Scand*. 2019 Apr;139(4):369–76.
- Strzelczyk A, Steinig I, Willems LM, Reif PS, Senft C, Voss M, et al. Treatment of refractory and super-refractory status epilepticus with brivaracetam: A cohort study from two German university hospitals. *Epilepsy Behav*. 2017 May;70(Pt A):177–81.
- Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics*. 2007 Sep;3(3):211–21.
- Sutter R, Dittrich T, Semmlack S, Rüegg S, Marsch S, Kaplan PW. Acute Systemic Complications of Convulsive Status Epilepticus-A Systematic Review. *Crit Care Med*. 2018 Jan;46(1):138–45.
- Sutter R, Grize L, Fuhr P, Rüegg S, Marsch S. Acute-phase proteins and mortality in status epilepticus: a 5-year observational cohort study. *Crit Care Med*. 2013a Jun;41(6):1526–33.

- Sutter R, Kaplan PW, Rüegg S. Independent external validation of the status epilepticus severity score. *Crit Care Med*. 2013b Dec;41(12):e475-479.
- Takeda. A Phase 2, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Efficacy, Safety, and Tolerability of TAK-935 (OV935) as an Adjunctive Therapy in Pediatric Patients With Developmental and/or Epileptic Encephalopathies [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2021 Feb. Report No.: results/NCT03650452. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03650452>
- Tan TH-L, Perucca P, O'Brien TJ, Kwan P, Monif M. Inflammation, ictogenesis, and epileptogenesis: An exploration through human disease. *Epilepsia*. 2021 Feb;62(2):303–24.
- Tan X, Tu Z, Han W, Song X, Cheng L, Chen H, et al. Anticonvulsant and Neuroprotective Effects of Dexmedetomidine on Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Rats Using a Metabolomics Approach. *Med Sci Monit*. 2019 Mar 20;25:2066–78.
- Tan Z, Jiang J, Tian F, Peng J, Yang Z, Li S, et al. Serum Visinin-Like Protein 1 Is a Better Biomarker Than Neuron-Specific Enolase for Seizure-Induced Neuronal Injury: A Prospective and Observational Study. *Front Neurol*. 2020;11:567587.
- Tanioka S, Ishida F, Nakano F, Kawakita F, Kanamaru H, Nakatsuka Y, et al. Machine Learning Analysis of Matricellular Proteins and Clinical Variables for Early Prediction of Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Mol Neurobiol*. 2019 Oct;56(10):7128–35.
- Tawk RG, Grewal SS, Heckman MG, Rawal B, Miller DA, Edmonston D, et al. The Relationship Between Serum Neuron-Specific Enolase Levels and Severity of Bleeding and Functional Outcomes in Patients With Nontraumatic Subarachnoid Hemorrhage. *Neurosurgery*. 2016 Apr;78(4):487–91.
- Tekgul H, Simsek E, Erdoğan MA, Yiğittürk G, Erbaş O, Taşkiran D. The potential effects of anticonvulsant drugs on neuropeptides and neurotrophins in pentylenetetrazol kindled seizures in the rat. *Int J Neurosci*. 2020 Feb;130(2):193–203.
- The Lancet Respiratory Medicine. Opening the black box of machine learning. *Lancet Respir Med*. 2018 Nov;6(11):801.
- Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest*. 1977 Sep;37(5):385–90.
- Treiman DM, Meyers PD, Walton NY, Collins JF, Colling C, Rowan AJ, et al. A comparison of four treatments for generalized convulsive status epilepticus. Veterans Affairs Status Epilepticus Cooperative Study Group. *N Engl J Med*. 1998 Sep 17;339(12):792–8.
- Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, et al. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*. 2015 Oct;56(10):1515–23.
- Trinka E, Kälviäinen R. 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. *Seizure*. 2017 Jan;44:65–73.

- Trivedi LU, Alvarez CA, Mansi IA. Association of Statin Therapy With Risk of Epilepsy in 2 Propensity Score-Matched Cohorts. *Ann Pharmacother*. 2018;52(6):546–53.
- Tumani H, Otto M, Gefeller O, Wiltfang J, Herrendorf G, Mogge S, et al. Kinetics of serum neuron-specific enolase and prolactin in patients after single epileptic seizures. *Epilepsia*. 1999 Jun;40(6):713–8.
- Vezzani A, Conti M, De Luigi A, Ravizza T, Moneta D, Marchesi F, et al. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci*. 1999 Jun 15;19(12):5054–65.
- Vezzani A, Hoyer D. Brain somatostatin: a candidate inhibitory role in seizures and epileptogenesis. *Eur J Neurosci*. 1999 Nov;11(11):3767–76.
- Vizuete AFK, Hennemann MM, Gonçalves CA, de Oliveira DL. Phase-Dependent Astroglial Alterations in Li-Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Young Rats. *Neurochem Res*. 2017 Oct;42(10):2730–42.
- van Vliet EA, da Costa Araújo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2007 Feb;130(Pt 2):521–34.
- Walker MC. Pathophysiology of status epilepticus. *Neurosci Lett*. 2018 Feb 22;667:84–91.
- Walton NY. Systemic effects of generalized convulsive status epilepticus. *Epilepsia*. 1993;34 Suppl 1:S54-58.
- Wasterlain CG, Liu H, Mazarati AM, Baldwin RA, Shirasaka Y, Katsumori H, et al. Self-sustaining status epilepticus: a condition maintained by potentiation of glutamate receptors and by plastic changes in substance P and other peptide neuromodulators. *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 6:S134-143.
- Westover MB, Shafi MM, Bianchi MT, Moura LMVR, O'Rourke D, Rosenthal ES, et al. The probability of seizures during EEG monitoring in critically ill adults. *Clin Neurophysiol*. 2015 Mar;126(3):463–71.
- Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan;35(Database issue):D521-526.
- Wu YW, Shek DW, Garcia PA, Zhao S, Johnston SC. Incidence and mortality of generalized convulsive status epilepticus in California. *Neurology*. 2002 Apr 9;58(7):1070–6.
- Xie C, Sun J, Qiao W, Lu D, Wei L, Na M, et al. Administration of simvastatin after kainic acid-induced status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. *PLoS ONE*. 2011;6(9):e24966.
- Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue L-F, Beach TG, et al. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Aβ production. *Neurobiol Dis*. 2008 Mar;29(3):422–37.

- Yamanaka K, Saito Y, Yamamori T, Urano Y, Noguchi N. 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J Biol Chem*. 2011 Jul 15;286(28):24666–73.
- Yang A, Kantor B, Chiba-Falek O. APOE: The New Frontier in the Development of a Therapeutic Target towards Precision Medicine in Late-Onset Alzheimer's. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 27;22(3):1244.
- Yasiry Z, Shorvon SD. The relative effectiveness of five antiepileptic drugs in treatment of benzodiazepine-resistant convulsive status epilepticus: a meta-analysis of published studies. *Seizure*. 2014 Mar;23(3):167–74.
- Yechor N, Adeli A, Hafeez S. External validation of the epidemiology-based mortality score in status epilepticus in an American intensive care population. *Epilepsy Res*. 2018 Dec;148:32–6.
- Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci*. 2003 Dec 3;23(35):11104–11.
- Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell*. 2015 Apr;6(4):254–64.
- Zhang L, Guo Y, Hu H, Wang J, Liu Z, Gao F. FDG-PET and NeuN-GFAP Immunohistochemistry of Hippocampus at Different Phases of the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *International Journal of Medical Sciences*. 2015;12(3):288–94.
- Zhu S, Tai C, Petkau TL, Zhang S, Liao C, Dong Z, et al. Progranulin promotes activation of microglia/macrophage after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Research*. 2013 Sep;1530:54–65.
- Zongo D, Ribéreau-Gayon R, Masson F, Laborey M, Contrand B, Salmi LR, et al. S100-B protein as a screening tool for the early assessment of minor head injury. *Ann Emerg Med*. 2012 Mar;59(3):209–18.

Annexes

- **Annexe 1** : Article 6 : A severe form of epilepsy could be treated with cholesterol medication. New Scientist, 13 Novembre 2019.

- **Annexe 2** : Article 7 : Association of Clinical, Biological, and Brain Magnetic Resonance Imaging Findings with Electroencephalographic Findings for Patients with COVID-19. JAMA Network Open.

- **Annexe 3** : Article 8 : Older patients with COVID-19 and neuropsychiatric manifestations: study of risk factors for mortality. (soumis pour publication)

- **Annexe 4** : Article 9 : Epilepsy related to focal neuronal lipofuscinosis: extra-frontal localization, EEG signatures and GABA involvement. (soumis pour publication)

Annexe 1

Article 6 : A severe form of epilepsy could be treated with cholesterol medication. New Scientist, 13 Novembre 2019.

Cet article grand public a été écrit par Chelsea Whyte, journaliste au New Scientist à la suite de la présentation de mon poster « *Brain cholesterol metabolism as new pathway biomarkers of status epilepticus* » au congrès de la Society for Neurosciences en Octobre 2019 à Chicago.

Brain cholesterol metabolism as new pathway biomarkers of status epilepticus

A. Hanin¹, P. Baudin¹, S. Lecas¹, D. Roussel¹, E. Teysou¹, M. Damiano², D. Luis¹, V. Lambrecq^{1,2}, I. Plu³, B. Mathon⁴, D. Bonnefont-Rousselot⁵, S. Demeret⁶, R. Bittar⁷, F. Lamari⁸, and V. Navarro^{1,2}

¹Brain and Spine Institute/CNRS UMR 7225/INSERM 1127/Sorbonne Université, Paris, France; ²Neurophysiology Department and Epilepsy Unit, Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France; ³Neuropathology Department, Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France; ⁴Neurosurgery Department, Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France; ⁵Biochemistry Department, Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France; ⁶Neurology Department, Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France

INTRODUCTION

Status epilepticus (SE)

- Life-threatening prolonged epileptic seizure
- 30 cases per 100,000 individuals
- Refractory in around 25% of cases
- Excitotoxic processes
- Focal or diffuse brain atrophy (MRI)
- Subsequent irreversible neurological sequels
- Mortality (from 10 to 40% of cases)

OBJECTIVE

Identify a new metabolic pathway to explain the neuronal damages related to refractory SE

→ New neuroprotective therapy?

BACKGROUND AND RESULTS

Brain cholesterol homeostasis

Role of the CYP46A1 protein

- Turnover of brain cholesterol by conversion into 24S-hydroxycholesterol (24-OHC)
- Impact of *Cyp46a1* inhibition
- AAV-shRNA in the hippocampus, C57Bl/6J
- Brain cholesterol accumulation
- Neuronal loss
- Epileptic abnormalities

Hypotheses:

- CYP46A1 inhibition occurs during SE
- Secondary brain cholesterol accumulation participates in the excitotoxicity processes

CYP46A1 functional inhibition: failure to eliminate cholesterol

Higher ApoE levels: Storage of cholesterol in excess

Disturbance in cholesterol metabolism occur during SE

METHODS

Human study conducted on fluids and tissues of SE patients

1) Blood / CSF:

Age (x ± sd)	Ratio M/F	Controls (CONT):
SE (n=63)	50.28 ± 18.53	53%
CONT (n=92)	47.00 ± 18.84	45%

2) Human tissues extracts:

- Post mortem tissues: SE (n=8) and CONT (n=3)
- Surgery tissues: EPI, hippocampus (n=8)

Animal model of SE induced by injection of Kainate

Intrahippocampal injection Kainate (KA)/PBS (60 µl - 20 mM)

CS7Bl/6J, 8 weeks

Day of euthanasia: D1, D3, D7, D15

EEG, Biochemical analyses (LC/MS-MS), Immunohistochemistry

REFERENCES

Sánchez et al. J Clin Med. 2016; 5(6):57

Reinhold et al. Lancet Neurol. 2012; 12(10): 922-30

Lottgen et al. Epilepsia. 2015; 56(11):2133-42

Spillmann et al. J Lipid Res. 1996; 37:1594-1600

Ramirez et al. J Comp Neurol. 2008; 507: 1876-1883

Louis and Garcia. Biochimie. 2013; 95: 1954-63

Lötters et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(18):9799-800

Zhu et al. Brain Research. 2013; July; 1530: 54-65

Choi et al. Eur J Neurosci. 2015; 36(10):3195-55

Qing et al. Mol Neurobiol. 2015; 41: 299-313

Heinen et al. Brain Res. 2012; 1460: 51-59

CONCLUSION

CYP46A1 expression levels were not altered by SE; however we observed a functional inhibition of the CYP46A1 resulting in a strong decrease of the 24S-hydroxycholesterol synthesis and in a failure to eliminate brain cholesterol.

The lack of negative feedback mechanism triggered by the 24S-hydroxycholesterol on the cholesterol synthesis enzymes may induce an increase of the cholesterol synthesis both in brain through the Bloch pathway and in the peripheral compartment through the Kandutsch-Russell pathway.

We also observed disturbances in the lipid panels: a decrease of the esterified cholesterol levels, an increase of the serum ApoE levels which could indicate an increased lipid transport from the liver to the peripheral compartment and possibly to the brain.

Prospective: Correlate these lipid biomarkers with the clinical prognosis of SE patients and study the neuroprotective and anticonvulsant role of statins in KA-model

Contact: aurelie.hanin@icm-institute.org

A severe form of epilepsy could be treated with cholesterol medication

HEALTH 13 November 2019

By [Chelsea Whyte](#)



There may now be a new way to treat people prone to particularly severe seizures
Kelly J Hall/Getty Images

It may be possible to lessen the severity of a rare and potentially lethal form of epilepsy with common statins, which are used to lower cholesterol levels for people with heart disease.

Status epilepticus is a severe form of epilepsy in which seizures last more than 5 minutes and can sometimes go on for days or weeks, potentially leading to permanent brain damage or death.

Aurélie Hanin at the Brain and Spine Institute in Paris, France, and her colleagues analysed the blood and [cerebrospinal fluid](#) of 63 people with status epilepticus and compared the results with the same information from 92 people who either had epilepsy without these severe seizures or had a functional neurological disorder. The researchers also analysed the brain material of mice who had been induced to have the disorder.

They found an increase in cholesterol synthesis in the mice brains, and they saw signs indicating a similar increase in humans.

Read more: [Stem cells implanted into the brain stop epilepsy seizures in rats](#)

Cholesterol can't cross an intact [blood-brain barrier](#) – the protective cell structure that helps stop toxins passing from the bloodstream to the brain – without being broken down by an enzyme in the nervous system.

The researchers looked for a byproduct of this breakdown in the human blood plasma. In people with status epilepticus, they found a significant decrease, and they also saw higher levels of a protein that transports cholesterol. Hanin says these two signs indicate that in people with status epilepticus, cholesterol isn't being eliminated and is instead being stored up in the brain. She presented the work at a meeting of the Society for Neuroscience in Chicago on 20 October.

“To treat the increase of cholesterol synthesis in the brain, you have to use a statin able to cross the blood-brain barrier, but currently there are only three statins that are able to do that,” she says.

She adds that there haven't been studies to evaluate the effect of statins on this type of neurological disorder. But [a retrospective study in 2014](#) found that people who were previously on [statins](#) to treat heart disease and later developed status epilepticus had a lower rate of death due to seizures.

Hanin says she and her colleagues would like to begin animal trials and later clinical trials to test the best types of statins to treat status epilepticus. “Statins are not able to stop the status epilepticus,” she says, “but they could be used to decrease the consequences of these seizures.”

More on these topics: [epilepsy](#) [health](#)

Annexe 2

Article 7 : Association of Clinical, Biological, and Brain Magnetic Resonance Imaging Findings with Electroencephalographic Findings for Patients with COVID-19. JAMA Network Open.

Authors:

Virginie Lambrecq, MD, PhD^{1,2,3*,#}; **Aurélie Hanin, PharmD^{1*}**; Esteban Munoz Musat, MD^{1,2,3}; Lydia Chougar, MD^{1,3,4}; Salimata Gassama, MD⁵; Cécile Delorme, MD⁵; Louis Cousyn, MD^{1,3,5}; Alaina Borden, MD²; Maria Damiano, MD, PhD^{2,5}; Valerio Frazzini, MD, PhD^{1,2,5}; Gilles Huberfeld, MD, PhD^{2,3}; Frank Landgraf, MD²; Vi-Huong Nguyen-Michel, MD²; Phintip Pichit, MD^{2,5}; Aude Sangare, MD^{1,2}; Mario Chavez, PhD¹; Capucine Morélot-Panzini, MD, PhD^{3,6}; Elise Morawiec, MD^{3,6}; Mathieu Raux, MD, PhD^{1,3,7}; Charles-Edouard Luyt, MD, PhD^{3,8,9}; Pierre Rufat MD¹⁰; Damien Galanaud, MD, PhD^{1,3,4}; Jean-Christophe Corvol, MD, PhD^{1,5}; Catherine Lubetzki, MD, PhD^{1,3,5}; Benjamin Rohaut, MD, PhD^{1,3,5}; Sophie Demeret, MD⁵; Nadya Pyatigorskaya, MD, PhD^{1,3,4}; Lionel Naccache, MD, PhD^{1,2,3}; Vincent Navarro, MD, PhD^{1,2,3,5,11}; On behalf of the CoCo Neuroscience study group.

* These authors contributed equally to this work.



Original Investigation | Infectious Diseases

Association of Clinical, Biological, and Brain Magnetic Resonance Imaging Findings With Electroencephalographic Findings for Patients With COVID-19

Virginie Lambrecq, MD, PhD; Aurélie Hanin, PharmD; Esteban Munoz-Musat, MD; Lydia Chougar, MD; Salimata Gassama, MD; Cécile Delorme, MD; Louis Cousyn, MD; Alaina Borden, MD; Maria Damiano, MD, PhD; Valerio Frazzini, MD, PhD; Gilles Huberfeld, MD, PhD; Frank Landgraf, MD; Vi-Huong Nguyen-Michel, MD; Phintip Pichit, MD; Aude Sangare, MD; Mario Chavez, PhD; Capucine Morélot-Panzini, MD, PhD; Elise Morawiec, MD; Mathieu Raux, MD, PhD; Charles-Edouard Luyt, MD, PhD; Pierre Rufat, MD; Damien Galanaud, MD, PhD; Jean-Christophe Corvol, MD, PhD; Catherine Lubetzki, MD, PhD; Benjamin Rohaut, MD, PhD; Sophie Demeret, MD; Nadya Pyatigorskaya, MD, PhD; Lionel Naccache, MD, PhD; Vincent Navarro, MD, PhD; for the Cohort COVID-19 Neurosciences (CoCo Neurosciences) Study Group

Abstract

IMPORTANCE There is evidence of central nervous system impairments associated with coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection, including encephalopathy. Multimodal monitoring of patients with COVID-19 may delineate the specific features of COVID-19–related encephalopathy and guide clinical management.

OBJECTIVES To investigate clinical, biological, and brain magnetic resonance imaging (MRI) findings in association with electroencephalographic (EEG) features for patients with COVID-19, and to better refine the features of COVID-19–related encephalopathy.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS This retrospective cohort study conducted in Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France, enrolled 78 hospitalized adults who received a diagnosis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and underwent EEG between March 30 and June 11, 2020.

EXPOSURES Detection of SARS-CoV-2 from a nasopharyngeal specimen using a reverse transcription-polymerase chain reaction assay or, in the case of associated pneumonia, on a computed tomography scan of the chest.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES Data on the clinical and paraclinical features of the 78 patients with COVID-19 were retrieved from electronic patient records.

RESULTS Of 644 patients who were hospitalized for COVID-19, 78 (57 men [73%]; mean [SD] age, 61 [12] years) underwent EEG. The main indications for EEG were delirium, seizure-like events, and delayed awakening in the intensive care unit after stopping treatment with sedatives. Sixty-nine patients showed pathologic EEG findings, including metabolic-toxic encephalopathy features, frontal abnormalities, periodic discharges, and epileptic activities. Of 57 patients who underwent brain MRI, 41 showed abnormalities, including perfusion abnormalities, acute ischemic lesions, multiple microhemorrhages, and white matter–enhancing lesions. Fifty-five patients showed biological abnormalities, including dysnatremia, kidney failure, and liver dysfunction, the same day as the EEG. The results of cerebrospinal fluid analysis were negative for SARS-CoV-2 for all tested patients. Nine patients who had no identifiable cause of brain injury outside COVID-19 were further isolated; their brain injury was defined as COVID-19–related encephalopathy. They represented 1% (9 of 644) of patients with COVID-19 requiring hospitalization. Six of these 9 patients had movement disorders, 7 had frontal syndrome, 4 had brainstem impairment, 4 had periodic EEG discharges, and 3 had MRI white matter–enhancing lesions.

(continued)

Key Points

Question Can electroencephalography (EEG), combined with clinical, biological, and magnetic resonance imaging (MRI) analyses, help to better characterize patients with neurologic coronavirus disease 2019 (COVID-19) and diagnose specific COVID-19–related encephalopathy?

Findings Neurologic manifestations, biological findings, EEG findings, and brain MRI images were analyzed in a cohort study of 78 adult patients with COVID-19. Nine patients had no identified cause of brain injury, as revealed by biological and MRI findings; their injury was defined as COVID-19–related encephalopathy.

Meaning This study suggests that, although neurologic manifestations, EEG findings, and MRI findings may appear heterogeneous and nonspecific, multimodal monitoring may better identify patients with COVID-19–related encephalopathy and guide treatment strategy.

+ Supplemental content

Author affiliations and article information are listed at the end of this article.

Open Access. This is an open access article distributed under the terms of the CC-BY License.

JAMA Network Open. 2021;4(3):e211489. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.1489

March 15, 2021 1/14

Abstract (continued)

CONCLUSIONS AND RELEVANCE The results from this cohort of patients hospitalized with COVID-19 suggest there are clinical, EEG, and MRI patterns that could delineate specific COVID-19-related encephalopathy and guide treatment strategy.

JAMA Network Open. 2021;4(3):e211489. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.1489

Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) may damage the central nervous system (CNS).^{1,2} Brain magnetic resonance imaging (MRI) results or cerebrospinal fluid findings may be suggestive of encephalitis or may be normal for patients with CNS symptoms.^{3,4} Electroencephalography (EEG) is a tool to identify neurologic injury and understand underlying mechanisms. At the beginning of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, periodic EEG discharges with triphasic morphologic characteristics were reported in 1 patient with alteration of consciousness,⁵ with unremarkable results of cerebrospinal fluid analysis and brain MRI. Frontal periodic EEG discharges were further reported in 5 critically ill patients with COVID-19.⁶ To our knowledge, few studies have evaluated EEG findings together with clinical, biological, and MRI findings in patients with COVID-19, and these studies did not show evidence of specific patterns.⁷⁻⁹

Here, we aimed to better characterize patients with neurologic COVID-19 and, possibly, to identify a subgroup of patients with COVID-19-related encephalopathy (CORE). We combined EEG with clinical, biological, and MRI findings in a cohort study of 78 patients. We had 3 main goals: (1) to provide a description of the clinical symptoms and the biological, EEG, and MRI patterns observed in these patients, including their frequency and their prognostic value; (2) to analyze EEG patterns in light of MRI, clinical, and biological findings; and (3) to further define CORE.

Methods

Study Design and Participants

We included all consecutive adult inpatients with confirmed COVID-19¹ (based on the results of a nasopharyngeal reverse transcription-polymerase chain reaction test or a chest computed tomography scan) who underwent EEG for neurologic symptoms in the Pitié-Salpêtrière Neurophysiology Department between March 30 and June 11, 2020. This study received approval from the Sorbonne Université Ethic Committee. All patients or relatives provided written consent. The study design and report are in accordance with the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) reporting guideline.

Data Collection

Electroencephalography was performed over 20 minutes with SystemPlus Evolution (Micromed) using 8 to 21 channels, and the results were analyzed prospectively in a longitudinal bipolar montage.¹⁰ Demographic, clinical, and biological data were extracted from the electronic medical records. Clinical evaluation was performed before EEG, and then we reviewed neurologic symptoms and summarized into syndromes. For patients who had another neurologic evaluation before hospital discharge, we reported the proportion of patients with a total recovery of neurologic symptoms and the association of persistent neurologic symptoms with patient autonomy. Magnetic resonance imaging scans were performed using the 3.0-T MRI system (Premier; GE Healthcare) with a 48-channel receive head coil.³

Electroencephalographic features were analyzed in light of clinical and biological characteristics and the therapeutics received on the day of EEG. We performed a detailed analysis of biological findings and focused on all disturbances (hyponatremia, hypocalcemia, renal insufficiency, hepatic

dysfunction, hypercapnia, and hyperosmolarity; **Table 1¹¹**) that were able to induce an encephalopathy pattern during EEG. If one of these disturbances was reported, the patient was classified as a patient with biological abnormality. Similarly, we reported all drugs taken by the patient at time of EEG. If the patient was under sedation or taking drugs with possible CNS adverse effects (antibiotic, pain medication, or psychotropic medications), we considered the possibility that the EEG findings may be affected by these drugs.¹²

Statistical Analysis

Pairwise comparisons were performed using *t* tests or Mann-Whitney tests when appropriate to evaluate the association of an intensive care unit (ICU) stay with EEG findings or the prognostic significance of EEG alterations. We performed univariable logistic regression analyses to identify paraclinical variables that differ between patients with CORE and other patients. The sequential rejective Benjamini-Hochberg test procedure was used to correct for multiple comparisons. Next, in the cohort of the 57 patients who underwent both EEG and brain MRI, we performed a backward stepwise logistic regression procedure to select the variables most associated with CORE (*n* = 5).

We then used a multivariable logistic regression model with the 5 variables previously selected. The performance of the model was evaluated according to the area under the receiver operating characteristic curve. We also reported sensitivity and specificity. To evaluate the classification performance, we performed a 100-fold cross-validation. Our data set was partitioned into 2 folds: 70% of the patients were used for training, and 30% for testing. All *P* values were from 2-sided tests and results were deemed statistically significant at *P* < .05. Analyses were performed with R software, version 3.5.0 (R Foundation for Statistical Computing).

Results

Population Characteristics

During the inclusion period, 644 patients were hospitalized for COVID-19 in Pitié-Salpêtrière Hospital and 78 underwent EEG (57 men and 21 women; mean [SD] age, 61 [12] years; and mean [SD] delay after COVID-19 onset, 29 [21] days). Seven of the 78 patients (9%) died at hospital discharge. Forty-three of the 71 surviving patients (61%) underwent a new neurologic evaluation before hospital discharge; 15 patients (35%) had a total recovery of neurologic symptoms, while 28 patients (65%) had persistent neurologic symptoms. Among these patients, 22 were studied for autonomy at discharge, and 8 (36%) were considered fully dependent.

Clinical Findings

Before the patients underwent EEG, the most frequent neurologic manifestations were delirium (*n* = 44), movement disorders (*n* = 15, including tremor [*n* = 3], dyskinesia [*n* = 2], akathisia [*n* = 2], myorhythmia [*n* = 2], and myoclonus [*n* = 8]), anosmia (*n* = 12), seizures (*n* = 10, including status epilepticus [*n* = 3], focal seizures [*n* = 2], and generalized seizures [*n* = 5]), and oculomotor disorders (*n* = 6) (Table 1¹¹). At hospital discharge, all neurologic manifestations were summarized into syndromes, such as disorder of consciousness (*n* = 28), frontal syndrome (*n* = 15), brainstem impairment (*n* = 7), and cerebellar syndrome (*n* = 5).

EEG Findings

The main indications for EEG were delirium (24 of 78 [31%]), seizure-like events (22 of 78 [28%]), and delayed awakening after stopping sedatives (17 of 78 [22%]). Electroencephalographic abnormalities were identified in 69 patients: periodic discharges (*n* = 6); epileptic activities (*n* = 4); an abnormal EEG background without periodic EEG discharges, epileptic activities, or frontal slow waves (*n* = 12); and frontal slow waves (*n* = 47). The latter included an encephalopathy pattern (ie, reactive triphasic or rhythmic diffuse waves with bifrontal predominance; *n* = 23) and frontal slow waves (unilateral or bilateral and symmetric or nonsymmetric; *n* = 24) (Figure 1).

Table 1. Characteristics of Patients

Demographic and clinical findings	No./total No. (%)
Patients with positive RT-PCR results	64/72 (89)
Patients with SARS-CoV-2-associated pneumonia on CT scan results	59/68 (87)
COVID-19 severity, mean (SD) ^a	5.32 (1.30)
Deceased patients at discharge	7/78 (9)
Patients with medical comorbidities	63/77 (82)
Cardiovascular disease	40/77 (52)
Lung disease	9/77 (12)
Diabetes	25/76 (33)
Tobacco use	16/75 (21)
Obesity	16/76 (21)
Immunosuppression	2/75 (3)
Cancer	7/75 (9)
Patients requiring ICU admission	49/78 (63)
Delay between the first COVID-19 symptoms and ICU admission, mean (SD), d	12.4 (11.3)
Patients requiring antibiotics, neuroleptics, or anesthetics ^b	40/71 (56)
Cardiopulmonary arrest	4/78 (5)
Symptoms reported before EEG	
Anosmia	12/66 (18)
Ageusia	9/66 (14)
Headache	8/75 (11)
Delirium	44/78 (56)
Seizures	10/78 (13)
Dizziness	2/73 (3)
Visual disturbances	1/75 (1)
Oculomotor disorders	6/74 (8)
Movement disorders	15/72 (21)
Sleep disorders	4/72 (6)
Neurologic syndromes reported during hospital care	
Language disorder	16/78 (21)
Disorder of consciousness	28/78 (36)
Brainstem impairment	7/78 (9)
Cerebellar syndrome	5/78 (6)
Cognitive disorders	36/78 (46)
Frontal syndrome	15/78 (19)
Worsening of preexistent cognitive disorders	7/78 (9)
Psychiatric disorders	4/78 (5)
EEG findings	
Delay between the first COVID-19 symptoms and the EEG, mean (SD), d	29.4 (21.3)
EEG performed in ICU	41/78 (53)
EEG performed under anesthesia	23/71 (32)
EEG performed in intubated patients	14/78 (18)
Normal EEG	9/78 (12)
Abnormal background activity	63/78 (81)
Focal abnormality	35/78 (45)
Frontal	24/35 (69)
Temporal	11/35 (31)
Other	6/35 (17)
Epileptic activities (interictal, n = 4; seizures, n = 1) ^c	4/78 (5)
Periodic discharges	6/78 (8)
Encephalopathy pattern	23/78 (30)

(continued)

Table 1. Characteristics of Patients (continued)

Demographic and clinical findings	No./total No. (%)
MRI findings	
Patients who underwent MRI	57/78 (73)
Unremarkable MRI findings	16/57 (28)
Hemorrhages	
Multiple microhemorrhages	10/21 (48)
Corpus callosum injury	4/21 (19)
Acute ischemic lesions	
Gray matter injury	13/57 (23)
White matter enhancing lesions	5/57 (9)
Basal ganglia abnormalities	4/57 (7)
Hypoxic-ischemic lesions	3/57 (5)
Metabolic abnormalities	3/57 (5)
PRES lesions	2/57 (4)
Leptomeningeal contrast enhancement	2/57 (4)
CLOCC	1/57 (2)
Perfusion abnormalities	
Hypoperfusion	
Frontal hypoperfusion	14/19 (74)
Temporal hypoperfusion	10/19 (53)
Other location hypoperfusion	15/19 (79)
Hyperperfusion	
Frontal hyperperfusion	3/4 (75)
Temporal hyperperfusion	4/4 (100)
Other location hyperperfusion	2/4 (50)
Biological findings the day of the EEG	
Patients with biological abnormalities^d	
Hyponatremia (sodium, <135 mEq/L)	11/76 (15)
Hypernatremia (sodium, >145 mEq/L)	13/76 (17)
Hypocalcemia (calcium, <8 mg/dL)	25/61 (41)
Renal insufficiency (according to creatinine clearance)	32/67 (48)
Hepatic dysfunction (AST and/or ALT 3 times higher than the standard)	10/65 (15)
Hypercapnia (>45 mm Hg)	13/45 (29)
Hyperosmolarity (>310 mOsm/kg)	13/40 (33)
Patients with lumbar puncture	
Delay between the first COVID-19 symptoms and the lumbar puncture, mean (SD), d	29.2 (25.3)
Patients with positive RT-PCR results in CSF	0/26
Patients with increased CSF elements (>5/mm ³)	3/30 (10)
Patients with increased CSF proteins (>0.65 g/L)	4/30 (13)

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CLOCC, cytotoxic lesion of the corpus callosum; COVID-19, coronavirus disease 2019; CSF, cerebrospinal fluid; CT, computed tomography; EEG, electroencephalogram; ICU, intensive care unit; MRI, magnetic resonance imaging; PRES, posterior reversible encephalopathy syndrome; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

SI conversion factors: To convert sodium to millimoles per liter, multiply by 1.0; and calcium to millimoles per liter, multiply by 0.25.

^a COVID-19 severity was evaluated according to the World Health Organization nadir scale¹¹: 1, nonhospitalized patients without activity limitation; 2, nonhospitalized patients with activity limitation; 3, hospitalized patients without oxygen requirement; 4, hospitalized patients with oxygen requirement; 5, hospitalized patients with noninvasive ventilation; 6, hospitalized patients with invasive ventilation; and 7, deceased patient at discharge.

^b We evaluated all drugs taken by patient the day of the EEG.

^c One patient had both interictal epileptic activities and seizures.

^d Patients were assessed as having biological abnormalities if they presented with one of the following abnormalities: hyponatremia, hypernatremia, hypocalcemia, renal insufficiency, hepatic dysfunction, hypercapnia, or hyperosmolarity.

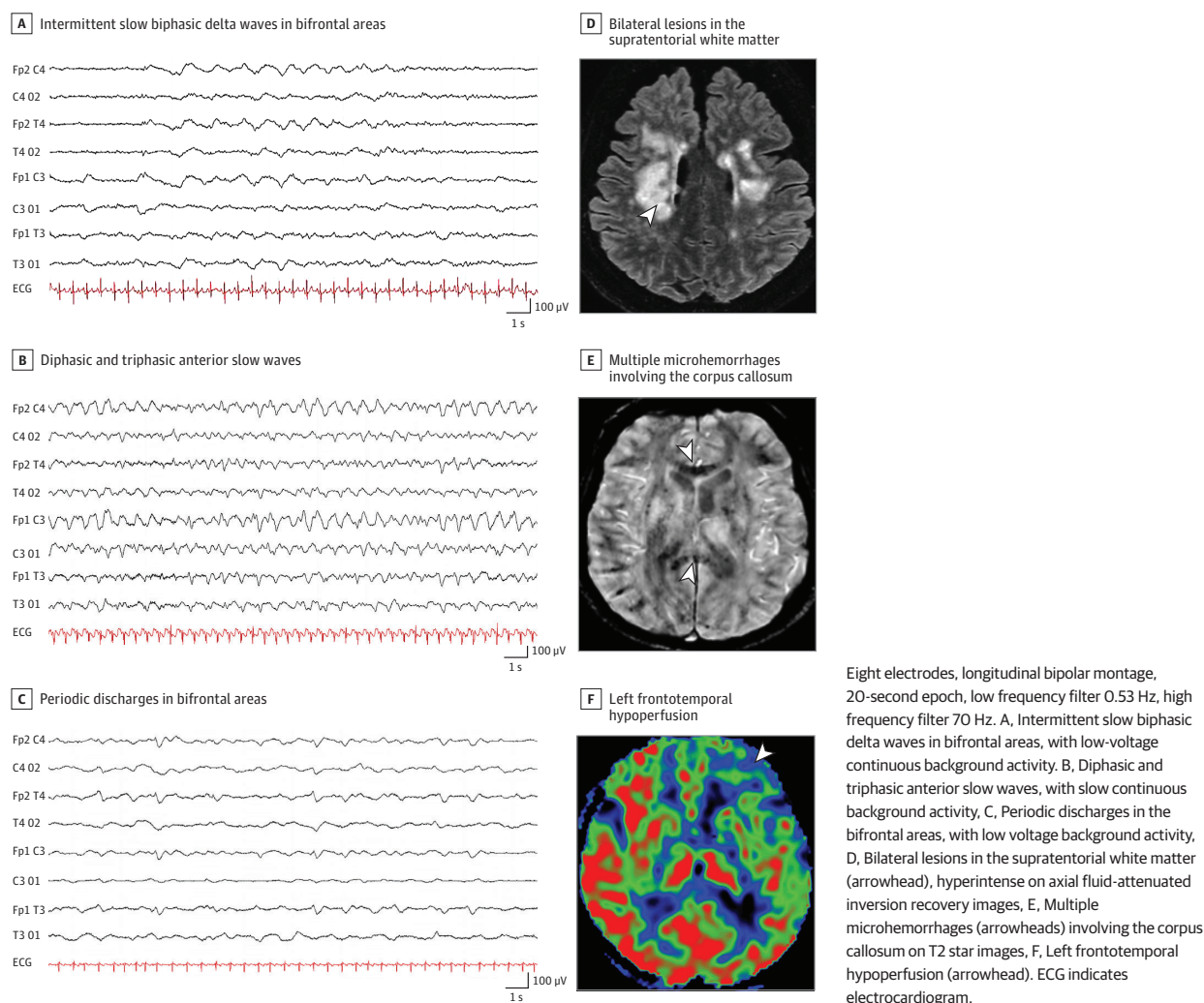
Patients in the ICU experienced more abnormal background activity than patients not in the ICU (39 of 41 [95%] vs 24 of 37 [65%]; $P < .001$). Nevertheless, the periodic discharges, epileptic activities, focal abnormalities, or encephalopathy patterns were seen in both ICU patients and non-ICU patients.

Among the 35 patients with focal abnormalities, 17 were studied for autonomy at discharge. Those with focal frontal abnormalities had a less-frequent total recovery of neurologic symptoms at hospital discharge than those with other abnormalities (1 of 10 [10%] vs 4 of 7 [57%]; $P = .05$). No EEG pattern was associated with death at hospital discharge.

MRI Findings

Of 57 patients who underwent MRI, 41 had abnormalities: acute ischemic lesions ($n = 13$), white matter-enhancing lesions ($n = 5$), basal ganglia abnormalities ($n = 4$), and metabolic lesions (ie, central pontine myelinolysis) ($n = 3$). Twenty patients had perfusion abnormalities—almost entirely

Figure 1. Examples of Electroencephalogram Recordings and Magnetic Resonance Imaging Findings



hypoperfusion (n = 19) (Figure 1). The results of MRI scans were more frequently unremarkable than EEG findings (16 of 57 [28%] vs 9 of 78 [12%]; $P = .02$).

Drugs and Biological Findings

Electroencephalographic features were explained according to major confounders at the time of EEG. Fifty-five patients showed biological abnormalities, including dysnatremia, kidney failure, and liver dysfunction, the same day as the EEG procedure. Of 23 patients with encephalopathy, 7 received antibiotics, 1 received a neuroleptic drug, and 4 received light sedation on the day of EEG.¹³ Eighteen patients had biological abnormalities (moderate to severe renal insufficiency [n = 5], hypernatremia [n = 3], and hyponatremia [n = 1]).

No patients had positive reverse transcription-polymerase chain reaction results from cerebrospinal fluid samples (n = 26). No patients received immunomodulatory treatments before EEG.

EEG Results and Related Clinical and Paraclinical Findings

The neurologic manifestations and MRI abnormalities were described according to EEG patterns (eTable in the Supplement). Owing to the large heterogeneity of clinical, MRI, and EEG findings, we were not able to show specific correlations between those findings. Three of 4 patients with epileptic activities detected by EEG had previous seizures, and 5 of 24 patients with EEG frontal abnormalities had frontal syndrome.

An overview of the most specific EEG and brain MRI findings is represented according to clinically defined syndromes in Figure 2. In our cohort, patients with disorder of consciousness, brainstem impairment, or frontal syndrome seemed to more frequently have EEG or MRI abnormalities than those with cerebellar syndrome or psychiatric disorders.

Patients With COVID-19-Related Encephalopathy

To isolate a subgroup of patients with specific COVID-19-related brain injury, we distinguished patients with an identified cause of central neurologic disorders from those without. Based on clinical and paraclinical findings, the causes were as follows: ICU complications (n = 37), isolated metabolic or toxic encephalopathy (n = 8), cerebrovascular disorders (n = 6), previous mild cognitive impairment (n = 3), intracranial tumors (n = 2), isolated seizures and epilepsy (n = 6), history of psychiatric disorders (n = 3), cardiorespiratory arrest (n = 3), multiorgan failure (n = 2), associated varicella zoster virus encephalitis (n = 1), and headache (n = 1).

The 9 remaining patients who had acute neurologic injuries with duration more than 48 hours, without any identified cause of encephalopathy (clinical, MRI, or biological), were assessed as patients with CORE (Figure 2; Table 2). Compared with patients without CORE, those with CORE presented more frequently with movement disorders (6 of 9 [67%] vs 9 of 63 [14%]; $P = .002$), frontal syndrome (7 of 9 [78%] vs 8 of 69 [12%]; $P < .001$), brainstem impairment (4 of 9 [44%] vs 3 of 69 [4%]; $P < .001$), periodic EEG discharges (4 of 9 [44%] vs 2 of 69 [3%]; $P < .001$), and white matter-enhancing MRI lesions (3 of 9 [33%] vs 2 of 48 [4%]; $P = .03$).

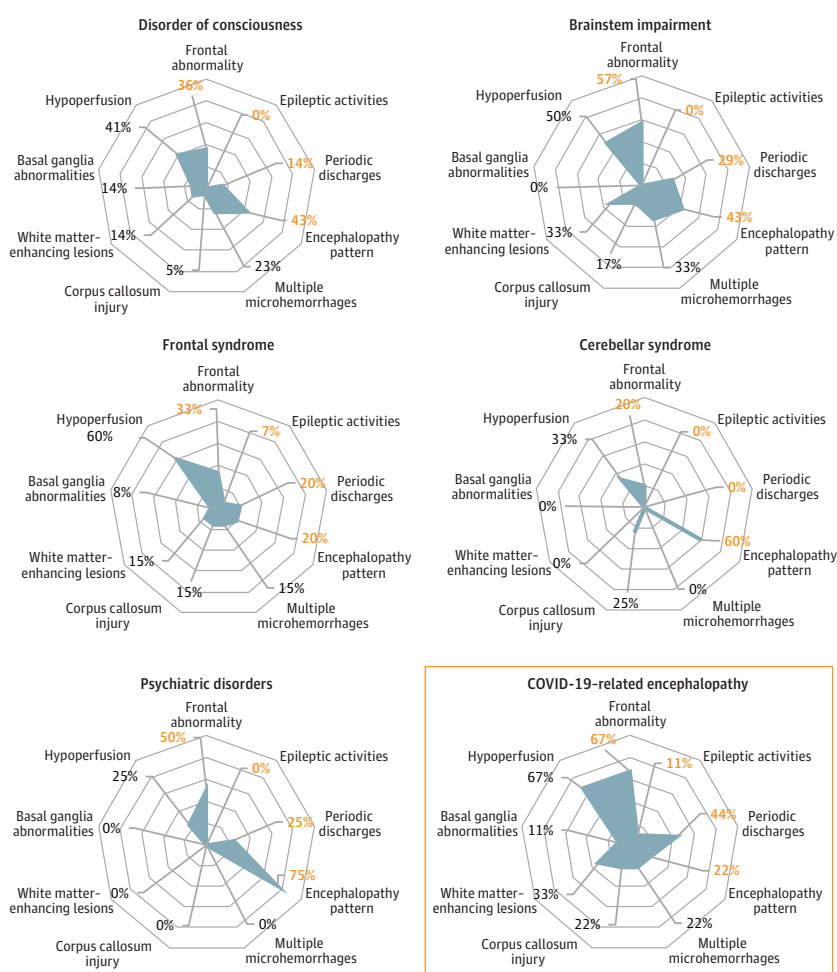
Using clinical, EEG, and MRI data, we developed a model to identify patients with CORE, taking into account variable risk. The regression model included periodic EEG discharges, movement disorders, brainstem impairment, frontal syndrome, and white matter-enhancing MRI lesions. The model resulted in an area under the receiver operating characteristics curve of 0.94 (95% CI, 0.88-1.00; $P < .001$) (Figure 3). After a 100-fold cross-validation, the model was able to estimate the risk for a new patient to present with CORE with a sensitivity of 76% (95% CI, 33%-100%), specificity of 93% (95% CI, 86%-100%), positive predictive value of 65% (95% CI, 33%-100%), negative predictive value of 95% (95% CI, 86%-100%), and accuracy of 91% (95% CI, 76%-100%).

Discussion

We report on a cohort of 78 patients with COVID-19 who underwent EEG for a wide range of CNS manifestations. Recent case reports, small series, and meta-analyses assessing the value of EEG for patients with COVID-19^{5-9,14-17} showed (1) nonspecific patterns, reflecting the diversity of SARS-CoV-2 infection complications,^{1,7,9,14-17} or (2) a striking periodic EEG pattern,^{5,6,8,17} suggestive of COVID-19-specific brain complications. Nevertheless, a systematic correlation of EEG findings with biological findings and brain MRI findings was lacking, precluding a better understanding of pattern origins.

We performed a multimodal evaluation of patients with COVID-19. Their neurologic complications were sometimes associated with ICU complications, preexisting pathologic conditions, toxic or metabolic encephalopathies, or strokes.^{1,14} The existence of specific COVID-19 brain complications is still being debated. Eight patients with SARS-CoV-2 infection and irritability, delirium, drowsiness, and new-onset epilepsy were reported.¹⁴ Additional reports further reinforced the hypothesis of brain-specific COVID-19 involvement, including marked brain metabolism changes detected on fluorodeoxyglucose positron emission tomography scans.¹⁸ We defined this brain involvement as CORE. In our study, we showed that patients with CORE mostly had movement

Figure 2. Representation of Electroencephalogram (EEG) and Brain Magnetic Resonance Imaging (MRI) Findings According to Neurologic Syndromes



Each radar chart is a graphical representation of the proportion of patients with the selected neurologic syndrome who had EEG findings (frontal abnormality, epileptic activities, periodic discharges, and encephalopathy pattern; percentage in orange) or MRI findings (multiple microhemorrhages, corpus callosum injury, white matter-enhancing lesions, basal ganglia abnormalities, and hypoperfusion; percentage in black). Each concentric circle represents a proportion of 20%. A blue line is drawn connecting the values (percentages) for each finding (EEG or MRI), giving the blue polygon appearance. The polygon represents the prevalence of EEG and MRI findings: the larger the area of the polygon is, the more abnormal EEG or MRI findings the patients had. Data are represented as proportion to take into account missing data. COVID-19 indicates coronavirus disease 2019.

Table 2. Characteristics of Patients With COVID-19–Related Encephalopathy

Characteristic	Patient No.									Unifying features
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Age, y	69	66	52	50	60	49	72	56	61	NA
Sex	M	F	M	M	F	M	M	M	M	NA
COVID-19 severity	6	4	6	6	1	6	4	6	6	NA
ICU admission	1	0	1	1	0	1	0	1	1	6/9
Delirium	0	1	1	1	0	0	0	0	0	3/9
Seizures	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1/9
Visual disturbances	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
Oculomotor disorders	1	0	0	0	0	1	1	1	1	5/9
Movement disorders	1	0	1	0	1	1	1	0	1	6/9
Language disorder	1	1	0	1	0	0	0	0	0	3/9
Disorder of consciousness	0	0	1	0	0	0	0	1	1	3/9
Brainstem impairment	0	0	1	0	0	1	0	1	1	4/9
Cerebellar syndrome	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2/9
Cognitive disorders	1	1	1	1	1	1	1	0	1	8/9
Frontal syndrome	1	1	0	1	1	1	1	0	1	7/9
Psychiatric disorders	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1/9
Treatment	IVIG	IVIG and CTC	NA	NA	CTC	PLEX and CTC	IVIG	CTC	PLEX and CTC	NA
CSF										
Elements	1	1	1	0	0	2	6	1	0	NA
Proteins	0.6	0.35	1.07	0.64	0.23	0.32	0.25	0.26	0.87	NA
Normal EEG results	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1/9
Abnormal background rhythm	1	1	1	1	0	1	0	1	1	7/9
EEG focal impairment	1	1	0	0	0	1	1	1	1	6/9
Frontal	1	1	NA	NA	NA	1	1	1	1	6/6
Temporal	0	1	NA	NA	NA	0	0	0	0	1/6
Periodic discharges	1	1	0	0	0	0	0	1	1	4/9
Encephalopathy pattern	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2/9
Epileptic activities	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1/9
MRI performed	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9/9
Hemorrhages	0	0	0	1	0	1	1	1	1	5/9
Microhemorrhages	NA	NA	NA	0	NA	1	0	1	0	2/5
Corpus callosum injury	NA	NA	NA	0	NA	1	1	0	0	2/5
Acute ischemic lesions	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2/9
Gray matter injury	1	0	0	0	0	1	0	0	1	3/9
White matter–enhancing lesions	0	0	0	1	0	1	0	1	0	3/9
Basal ganglia abnormalities	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1/9
Hypoxic ischemic lesions	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
Metabolic abnormalities	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
PRES lesions	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1/9
Leptomeningeal contrast enhancement	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
CLOCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/9
Perfusion disorders	1	1	1	1	0	0	NA	NA	0	4/7
Hyperperfusion	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	0/4
Hypoperfusion	1	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	4/4
Frontal	1	1	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	4/4
Temporal	0	0	0	1	NA	NA	NA	NA	NA	1/4

Abbreviations: CLOCC, cytotoxic lesions of the corpus callosum; COVID-19, coronavirus disease 2019; CSF, cerebrospinal fluid; CTC, corticosteroids; EEG, electroencephalogram; ICU, intensive care unit; IVIG, intravenous immunoglobulins; MRI, magnetic resonance

imaging; NA, not applicable; PLEX, plasma exchange; PRES, posterior reversible encephalopathy syndrome.

disorders (mainly seizures and/or myorhythmia), and brainstem impairment (oculomotor disorders such as bobbing) and frontal syndrome (disinhibition and grasping).

Similarly, MRI findings showed both (1) unspecific lesions, such as perfusion abnormalities, and (2) more specific lesions, such as basal ganglia abnormalities, microhemorrhages, corpus callosum injury, and white matter-enhancing lesions.³ The latter abnormality was the most significant lesion detected on MRI scans in patients with CORE (Table 2).

The most frequent EEG findings were abnormal background activity (81%) and frontal slow waves (60%). The latter were associated with metabolic and toxic encephalopathies—for which we identified 1 or several factors in most cases—or frontal lesions. Six patients (8%) showed a periodic EEG pattern, predominating in frontal lobes and not explained by MRI findings.

Our results are in accordance with previous reports; a recent meta-analysis reported abnormal background activity in almost all patients (96.1%),¹⁶ while half of all patients had focal slowing that involved the frontal region.¹⁷ A more specific periodic EEG pattern was also reported, with an incidence ranging from 0% to 38% according to the etiologic characteristics.^{6-9,15,16,19-23} Nevertheless, we found that this periodic EEG pattern had no prognostic value.

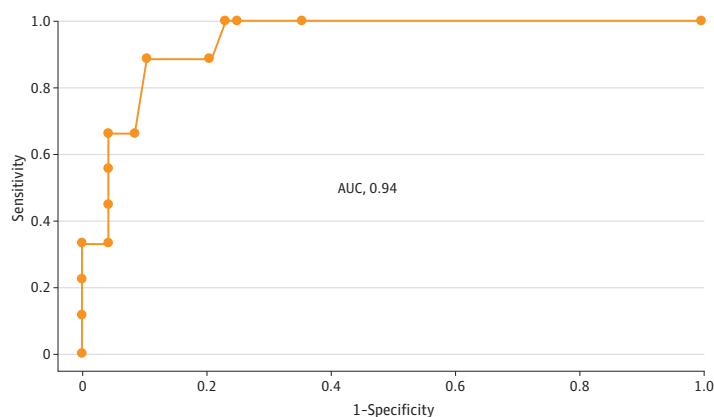
Epileptiform discharges and seizures have been reported in patients with COVID-19, with an incidence ranging from 0% to 63% for epileptiform discharges and from 0% to 25% for seizures.^{7-9,15,16,19-25} In our cohort, 4 patients (5%) had epileptiform discharges, and seizures occurred in 1 patient (1%) during EEG.

Patients with CORE had a periodic EEG pattern more frequently than other patients. All EEG abnormalities from the frontal lobe, coupled with the frontal syndrome noted in patients with CORE, suggest frontal lobe dysfunction, which is reminiscent of the hypothesis of a neuroinvasive entry of SARS-CoV-2 into the brain via the olfactory nerves or via the nasopharyngeal mucosa.^{18,26} A change in neuronal excitability, perhaps mediated by specific cytokines, may occur in brain areas close to the nasopharynx, such as the orbitofrontal lobe and the brainstem. Because inflammatory mechanisms, such as cytokine-mediated response or postviral autoimmune process, are suspected, immunomodulator treatments, such as plasma exchanges or intravenous immunoglobulins, may be proposed as early treatment for patients with CORE (Table 2).²⁶⁻²⁸

Limitations

This study has some limitations. A relatively small number of patients underwent both EEG and MRI in a single center. There was a lack of systematic follow-up after hospital discharge. There was also a

Figure 3. Clinical, Electroencephalogram (EEG), and Magnetic Resonance Imaging (MRI) Disturbances in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)-Related Encephalopathy



Receiver operating characteristic curve for the model, evaluating the performance of movement disorders, brainstem impairment, frontal syndrome, EEG periodic discharges, and white matter-enhancing MRI lesions to identify patients with COVID-19-related encephalopathy. AUC indicates area under the curve.

risk of underestimating the number of patients with CORE owing to other COVID-19-related comorbidities or pathologic conditions.

Conclusions

Despite different clinical presentations, our study suggests that EEG is a valuable procedure for patients with COVID-19 and neurologic symptoms, to better identify different brain dysfunctions and CORE. We further emphasize the benefit associated with combining EEG and brain MRI for patients with neurologic symptoms concomitant with COVID-19. It remains to be clarified whether treatment strategies could be optimized with earlier identification of patients with CORE.

ARTICLE INFORMATION

Accepted for Publication: January 22, 2021.

Published: March 15, 2021. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.1489

Open Access: This is an open access article distributed under the terms of the [CC-BY License](#). © 2021 Lambrecq V et al. *JAMA Network Open*.

Corresponding Author: Virginie Lambrecq, MD, PhD, Sorbonne Université, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Neurophysiology Department, GH Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, France (virginie.lambrecq@aphp.fr).

Author Affiliations: Sorbonne Université, Paris Brain Institute, Institut du Cerveau, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U 1127, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7225, Paris, France (Lambrecq, Hanin, Munoz-Musat, Chougar, Cousyn, Frazzini, Sangare, Chavez, Raux, Galanaud, Corvol, Lubetzki, Rohaut, Pyatigorskaya, Naccache, Navarro); Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Clinical Neurophysiology Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France (Lambrecq, Munoz-Musat, Borden, Damiano, Frazzini, Huberfeld, Landgraf, Nguyen-Michel, Pichit, Sangare, Naccache, Navarro); Neurophysiology Department, Sorbonne Université, Paris, France (Lambrecq, Munoz-Musat, Huberfeld, Naccache); Neuroradiology Department, Sorbonne Université, Paris, France (Chougar, Galanaud, Pyatigorskaya); Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Neuroradiology Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France (Chougar, Galanaud, Pyatigorskaya); Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Neurology Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France (Gassama, Delorme, Cousyn, Damiano, Frazzini, Pichit, Corvol, Lubetzki, Rohaut, Demeret, Navarro); Neurology Department, Sorbonne Université, Paris, France (Cousyn, Lubetzki, Rohaut, Navarro); Service de Pneumologie, Sorbonne Université, Paris, France (Morélot-Panzini, Morawiec); Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Service de Pneumologie, Médecine Intensive et Réanimation, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France (Morélot-Panzini, Morawiec); Department of Anesthesia, Critical Care and Peri-Operative Medicine, Sorbonne Université, Paris, France (Raux); Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Department of Anesthesia, Critical Care and Peri-Operative Medicine, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France (Raux); Institut de Cardiologie, Sorbonne Université, Paris, France (Luyt); Sorbonne Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche, 1166–Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France (Luyt); Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Service de Médecine Intensive Réanimation, Institut de Cardiologie, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France (Luyt); Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Biostatistic Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France (Rufat); Center of Reference for Rare Epilepsies, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France (Navarro).

Author Contributions: Drs Lambrecq and Hanin had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Drs Lambrecq and Hanin contributed equally to this work as co-first authors.

Concept and design: Lambrecq, Hanin, Munoz-Musat, Damiano, Lubetzki, Naccache, Navarro.

Acquisition, analysis, or interpretation of data: Lambrecq, Hanin, Munoz-Musat, Chougar, Gassama, Delorme, Cousyn, Borden, Frazzini, Huberfeld, Landgraf, Nguyen-Michel, Pichit, Sangare, Chavez, Morélot-Panzini, Morawiec, Raux, Luyt, Rufat, Galanaud, Corvol, Rohaut, Demeret, Pyatigorskaya, Navarro.

Drafting of the manuscript: Lambrecq, Hanin, Munoz-Musat, Nguyen-Michel, Navarro.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Lambrecq, Chougar, Gassama, Delorme, Cousyn, Borden, Damiano, Frazzini, Huberfeld, Landgraf, Nguyen-Michel, Pichit, Sangare, Chavez, Morélot-Panzini, Morawiec, Raux, Luyt, Rufat, Galanaud, Corvol, Lubetzki, Rohaut, Demeret, Pyatigorskaya, Naccache, Navarro.

Statistical analysis: Hanin, Cousyn, Pichit, Rufat, Pyatigorskaya.

Obtained funding: Corvol.

Administrative, technical, or material support: Lambrecq, Munoz-Musat, Morélot-Panzini, Galanaud, Corvol.

Supervision: Lambrecq, Hanin, Frazzini, Landgraf, Corvol, Naccache, Navarro.

Conflict of Interest Disclosures: Dr Huberfeld reported receiving personal fees from Advicenne, GW Pharma, and EISAI outside the submitted work. Dr Morélot-Panzini reported receiving personal fees from Astra-Zeneca, GSK, SOS Oxygène, ADEP, ISIS, Resmed, Chiesi, Menarini, Vivisol, Air Liquide, and Lowenstein outside the submitted work. Dr Raux reported receiving personal fees from Chiesi outside the submitted work. Dr Luyt reported receiving personal fees from Bayer Healthcare, Merck, ThermoFischer Brahms, Carmat, and Biomérieux outside the submitted work. Dr Corvol reported receiving grants from Fédération Internationale pour l'Automobile and Investissements d'avenir program during the conduct of the study; personal fees from Biogen, UCB, Prevail Therapeutic, Idorsia, Ever Pharma, Denali, Air Liquide, and Theranexus; and grants from Sanofi outside the submitted work. Dr Lubetzki reported receiving personal fees from Biogen, Merck-Serono, Roche, Rewind, and Ipsen outside the submitted work. Dr Pyatigorskaya reported receiving personal fees from GE Healthcare and Biogen; and grants from ANR outside the submitted work. Dr Navarro reported receiving personal fees from UCB Pharma, Liva Nova, and EISAI outside the submitted work. No other disclosures were reported.

Funding/Support: The Cohort COVID-19 Neurosciences (CoCo Neurosciences) study was sponsored by Assistance Publique des Hôpitaux de Paris and funded by the Fédération Internationale pour l'Automobile Foundation and donors of the Paris Brain Institute-ICM. This work received support from the Investissements d'avenir program (grant ANR-10-IAIHU-06), from the Fondation pour la Recherche Médicale (grant FDM20170839111), and from the Fondation Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (EPIRES-Marie Laure PLV Merchandising) for the conduct of the study.

Role of the Funder/Sponsor: The funding sources had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

The Cohort COVID-19 Neurosciences (CoCo Neurosciences) Study Group Members: Steering Committee (Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris): Cecile Delorme, MD; Jean-Christophe Corvol, MD, PhD; Jean-Yves Delattre, MD, PhD; Stephanie Carvalho; and Sandrine Sagnes. Scientific Committee (Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris): Bruno Dubois, MD, PhD; Vincent Navarro, MD, PhD; Celine Louapre, MD, PhD; Tanya Stojkovic, MD; Ahmed Idbaih, MD, PhD; Charlotte Rosso, MD, PhD; David Grabli, MD, PhD; Ana Zenovia Gales, MD; Bruno Millet, MD, PhD; Benjamin Rohaut, MD, PhD; Eleonore Bayen, MD, PhD; Sophie Dupont, MD, PhD; Gaelle Bruneteau, MD, PhD; Stephane Lehericy, MD, PhD; Danielle Seilhean, MD, PhD; Alexandra Durr, MD, PhD; Aurelie Kas, MD, PhD; Foudil Lamari, PharmD, PhD; Marion Houot; and Vanessa Batista Brochard. Principal investigators: *Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris:* Sophie Dupont, MD, PhD; Catherine Lubetzki, MD, PhD; Danielle Seilhean, MD, PhD; Pascale Pradat-Diehl, MD, PhD; Charlotte Rosso, MD, PhD; Khe Hoang-Xuan, MD, PhD; Bertrand Fontaine, MD, PhD; Lionel Naccache, MD, PhD; Philippe Fossati, MD, PhD; Isabelle Arnulf, MD, PhD; Alexandra Durr, MD, PhD; Alexandre Carpentier, MD, PhD; Stephane Lehericy, MD, PhD; and Yves Edel, MD; *Foch Hospital, Suresnes:* Anna Luisa Di Stefano, MD, PhD; *Rothschild Hospital, Paris:* Gilberte Robain, MD, PhD; and Philippe Thoumie, MD, PhD; *Avicenne Hospital, Bobigny:* Bertrand Degos, MD, PhD; *Sainte-Anne Hospital, Paris:* Tarek Sharshar, MD, PhD; *Saint-Antoine Hospital, Paris:* Sonia Alamowitch, MD, PhD; Emmanuelle Apartis-Bourdieu, MD, PhD; and Charles-Siegfried Peretti, MD, PhD; *Saint-Louis Hospital, Paris:* Renata Ursu, MD; *Tenon Hospital, Paris:* Nathalie Dzierzynski, MD; *Charles Foix Hospital, Ivry:* Kiyoka Kinugawa Bourron, MD, PhD; Joel Belmin, MD, PhD; Bruno Oquendo, MD; Eric Pautas, MD, PhD; and Marc Verry, MD, PhD. Co-investigators: *Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris:* Cecile Delorme, MD; Jean-Christophe Corvol, MD, PhD; Jean-Yves Delattre, MD, PhD; Yves Samson, MD, PhD; Sara Leder, MD; Anne Leger, MD; Sandrine Deltour, MD; Flore Baronnet, MD; Ana Zenovia Gales, MD; Stephanie Bombois, MD, PhD; Mehdi Touat, MD; Ahmed Idbaih, MD, PhD; Marc Sanson, MD, PhD; Caroline Dehais, MD, PhD; Caroline Houillier, MD; Florence Laigle-Donadey, MD; Dimitri Psimaras, MD; Agusti Alenton, MD, PhD; Nadia Younan, MD, PhD; Nicolas Villain, MD, PhD; David Grabli, MD, PhD; Maria del Mar Amador, MD; Gaelle Bruneteau, MD, PhD; Celine Louapre, MD, PhD; Louise-Laure Mariani, MD, PhD; Nicolas Mezouar, MD; Graziella Mangone, MD, PhD; Aurelie Meneret, MD, PhD; Andreas Hartmann, MD, PhD; Clement Tarrano, MD; David Bendetowicz, MD; Pierre-François Pradat, MD, PhD; Michel Baulac, MD, PhD; Sara Sambin, MD, PhD; Phintip Pichit, MD; Florence Chochoy, MD; Adele Hesters, MD; Bastien Herlin, MD; An Hung Nguyen, MD, PhD; Valerie Pourcher, MD, PhD; Alexandre Demoule, MD, PhD; Elise Morawiec, MD; Julien Mayaux, MD; Morgan Faure, MD; Claire Ewencyk, MD, PhD; Giulia Coarelli, MD; Anna Heinzmann, MD; Perrine Charles, MD, PhD; Tanya Stojkovic, MD; Marion Masingue, MD; Guillaume Bassez, MD, PhD; Vincent

Navarro, MD, PhD; Isabelle An, MD; Yulia Worbe, MD, PhD; Rabab Debs, MD; Esteban Munoz Musat, MD; Timothee Lenglet, MD; Virginie Lambrecq, MD, PhD; Aurelie Hanin, PharmD; Lydia Chougar, MD; Nathalia Shor, MD; Nadya Pyatigorskaya, MD, PhD; Damien Galanaud, MD, PhD; Delphine Leclercq, MD; Sophie Demeret, MD; Benjamin Rohaut, MD, PhD; Albert Cao, MD; Clemence Marois, MD; Nicolas Weiss, MD, PhD; Salimata Gassama, MD; Loic Le Guennec, MD, PhD; Vincent Degos, MD, PhD; Alice Jacquens, MD; Thomas Similowski, MD, PhD; Capucine Morelot-Panzini, MD, PhD; Jean-Yves Rotge, MD, PhD; Bertrand Saudreau, MD; Bruno Millet, MD, PhD; Victor Pitron, MD; Nassim Sarni, MD; Nathalie Girault, MD; Redwan Maatoug, MD; Ana Zenovia Gales, MD; Smaranda Leu, MD; Eleonore Bayen, MD, PhD; Lionel Thivard, MD, PhD; Karima Mokhtari, MD; and Isabelle Plu, MD, PhD; *Sainte-Anne Hospital, Paris*: Bruno Gonçalves; *Saint-Antoine Hospital, Paris*: Laure Bottin, MD; and Marion Yger, MD; *Rothschild Hospital, Paris*: Gaëlle Ouvrard, MD; and Rebecca Haddad, MD; *Charles Foix Hospital, Ivry*: Flora Ketz, MD; Carmelo Lafuente, MD, PhD; and Christel Oasi, MD. Other contributors—associated centers: *Lariboisière Hospital, Paris*: Bruno Megarbane, MD, PhD; and Dominique Herve, MD. Clinical research associates: *ICM, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris*: Haysam Salman; Armelle Rametti-Lacroux; Alize Chalançon; Anais Herve; Hugo Royer; Florence Beauzor; Valentine Maheo; Christelle Laganot; Camille Minelli; Aurelie Fekete; Abel Grine; Marie Biet; Rania Hilab; Aurore Besnard, PhD; Meriem Bouguerra; Gwen Goudard; Saïda Houairi; Saba Al-Youssef; Christine Pires; Anissa Oukhedouma; Katarzyna Siuda-Krzywicka; and Tal Seidel Malkinson; *Saint-Louis Hospital, Paris*: Hanane Agguini; *Foch Hospital, Suresnes*: Hassen Douzane; Data manager: *ICM, Paris*: Safia Said; and Statistician: *ICM, Paris*: Marion Houot.

Additional Contributions: Aurore Besnard, PhD, Neurophysiology Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, and Meriem Bouguerra, Paris Brain Institute, assisted with data recording; they were not compensated for their contributions. We thank the EEG technicians, the Cohort COVID-19 Neurosciences (CoCo Neurosciences) and the COVID SMIT PSL study groups for their participation to conduct the study and to data collection.

Additional Information: All anonymized data are available on request.

REFERENCES

1. Ellul MA, Benjamin L, Singh B, et al. Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol*. 2020;19(9):767-783. doi:10.1016/S1474-4422(20)30221-0
2. Nepal G, Rehrig JH, Shrestha GS, et al. Neurological manifestations of COVID-19: a systematic review. *Crit Care*. 2020;24(1):421. doi:10.1186/s13054-020-03121-z
3. Chougar L, Shor N, Weiss N, et al; CoCo Neurosciences Study Group. Retrospective observational study of brain MRI findings in patients with acute SARS-CoV-2 infection and neurologic manifestations. *Radiology*. 2020;297(3):E313-E323. doi:10.1148/radiol.2020202422
4. Paterson RW, Brown RL, Benjamin L, et al. The emerging spectrum of COVID-19 neurology: clinical, radiological and laboratory findings. *Brain*. 2020;143(10):3104-3120. doi:10.1093/brain/awaa240
5. Flamand M, Perron A, Buron Y, Szurhaj W. Pay more attention to EEG in COVID-19 pandemic. *Clin Neurophysiol*. 2020;131(8):2062-2064. doi:10.1016/j.clinph.2020.05.011
6. Vespignani H, Colas D, Lavin BS, et al. Report on electroencephalographic findings in critically ill patients with COVID-19. *Ann Neurol*. 2020;88(3):626-630. doi:10.1002/ana.25814
7. Petrescu A-M, Taussig D, Bouillieret V. Electroencephalogram (EEG) in COVID-19: a systematic retrospective study. *Neurophysiol Clin*. 2020;50(3):155-165. doi:10.1016/j.neucli.2020.06.001
8. Pellinen J, Carroll E, Friedman D, et al. Continuous EEG findings in patients with COVID-19 infection admitted to a New York academic hospital system. *Epilepsia*. 2020;61(10):2097-2105. doi:10.1111/epi.16667
9. Roberto KT, Espiritu AI, Fernandez MLL, Gutierrez JC. Electroencephalographic findings in COVID-19 patients: a systematic review. *Seizure*. 2020;82:17-22. doi:10.1016/j.seizure.2020.09.007
10. Hirsch LJ, LaRoche SM, Gaspard N, et al. American Clinical Neurophysiology Society's standardized critical care EEG terminology: 2012 version. *J Clin Neurophysiol*. 2013;30(1):1-27. doi:10.1097/WNP.0b013e3182784729
11. World Health Organization. WHO R&D blueprint: novel coronavirus: COVID-19 therapeutic trial synopsis. Published February 18, 2020. Accessed January 31, 2021. https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/COVID-19_Treatment_Trial_Design_Master_Protocol_synopsis_Final_18022020.pdf
12. Bhattacharyya S, Darby RR, Raibagkar P, Gonzalez Castro LN, Berkowitz AL. Antibiotic-associated encephalopathy. *Neurology*. 2016;86(10):963-971. doi:10.1212/WNL.0000000000002455
13. Devlin JW, Skrobik Y, Gélinas C, et al. Clinical practice guidelines for the prevention and management of pain, agitation/sedation, delirium, immobility, and sleep disruption in adult patients in the ICU. *Crit Care Med*. 2018;46(9):e825-e873. doi:10.1097/CCM.0000000000003299
14. Helms J, Kremer S, Merdji H, et al. Neurologic features in severe SARS-CoV-2 infection. *N Engl J Med*. 2020;382(23):2268-2270. doi:10.1056/NEJMc2008597

15. Galanopoulou AS, Ferastraoru V, Correa DJ, et al. EEG findings in acutely ill patients investigated for SARS-CoV-2/COVID-19: a small case series preliminary report. *Epilepsia Open*. 2020;5(2):314-324. doi:10.1002/epi4.12399
16. Kubota T, Gajera PK, Kuroda N. Meta-analysis of EEG findings in patients with COVID-19. *Epilepsy Behav*. 2020;107682. Published online December 4, 2020. doi:10.1016/j.yebeh.2020.107682
17. Antony AR, Haneef Z. Systematic review of EEG findings in 617 patients diagnosed with COVID-19. *Seizure*. 2020;83:234-241. doi:10.1016/j.seizure.2020.10.014
18. Delorme C, Paccoud O, Kas A, et al; CoCo-Neurosciences study group and COVID SMIT PSL study group. COVID-19-related encephalopathy: a case series with brain FDG-positron-emission tomography/computed tomography findings. *Eur J Neurol*. 2020;27(12):2651-2657. doi:10.1111/ene.14478
19. Canham LJW, Staniaszek LE, Mortimer AM, Nouri LF, Kane NM. Electroencephalographic (EEG) features of encephalopathy in the setting of Covid-19: a case series. *Clin Neurophysiol Pract*. 2020;5:199-205. doi:10.1016/j.cnp.2020.06.001
20. Pastor J, Vega-Zelaya L, Martín Abad E. Specific EEG encephalopathy pattern in SARS-CoV-2 patients. *J Clin Med*. 2020;9(5):E1545. doi:10.3390/jcm9051545
21. Ayub N, Cohen J, Jing J, et al. Clinical electroencephalography findings and considerations in hospitalized patients with coronavirus SARS-CoV-2. Preprint. Posted July 15, 2020. medRxiv 20152207. doi:10.1101/2020.07.13.20152207
22. Louis S, Dhawan A, Newey C, et al. Continuous electroencephalography characteristics and acute symptomatic seizures in COVID-19 patients. *Clin Neurophysiol*. 2020;131(11):2651-2656. doi:10.1016/j.clinph.2020.08.003
23. Pilato MS, Urban A, Alkawadri R, et al. EEG Findings in Coronavirus Disease. *J Clin Neurophysiol*. 2020. Published online July 1, 2020. doi:10.1097/WNP.0000000000000752
24. Cecchetti G, Vabanesi M, Chieffo R, et al. Cerebral involvement in COVID-19 is associated with metabolic and coagulation derangements: an EEG study. *J Neurol*. 2020;267(11):3130-3134. doi:10.1007/s00415-020-09958-2
25. Pasini E, Bisulli F, Volpi L, et al. EEG findings in COVID-19 related encephalopathy. *Clin Neurophysiol*. 2020;131(9):2265-2267. doi:10.1016/j.clinph.2020.07.003
26. Muccioli L, Pensato U, Cani I, et al. COVID-19-related encephalopathy presenting with aphasia resolving following tocilizumab treatment. *J Neuroimmunol*. 2020;349:577400. doi:10.1016/j.jneuroim.2020.577400
27. Muccioli L, Pensato U, Bernabè G, et al. Intravenous immunoglobulin therapy in COVID-19-related encephalopathy. *J Neurol*. 2020. doi:10.1007/s00415-020-10248-0
28. Cao A, Rohaut B, Le Guennec L, et al; CoCo-Neurosciences study group. Severe COVID-19-related encephalitis can respond to immunotherapy. *Brain*. 2020;143(12):e102. doi:10.1093/brain/awaa337

SUPPLEMENT.

eTable. EEG Results and Related Clinical and Paraclinical Findings

Supplementary Online Content

Lambrecq V, Hanin A, Munoz-Musat E, et al. Association of clinical, biological, and brain magnetic resonance imaging findings with electroencephalographic findings for patients with COVID-19. *JAMA Netw Open*. 2021;4(3):e211489. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.1489

eTable. EEG Results and Related Clinical and Paraclinical Findings

This supplementary material has been provided by the authors to give readers additional information about their work.

eTable. EEG Results and Related Clinical and Paraclinical Findings

78 patients / 57 patients with MRI EEG Clinical and MRI findings	Unremarkable EEG	Abnormal background activity	Focal abnormality				Epileptic activities (interictal, seizures)	Periodic discharges	Encephalopathy pattern
			All	Frontal	Temporal	Other			
All patients (n=78)	9	63	35	24	11	6	4	6	23
Delirium (n=44)	3	37	19	13	8	3	2	2	11
Seizures (n=10)	1	9	5	3	1	1	3	1	4
Movement disorders (n=15)	3	11	7	7	0	0	1	2	4
Language disorder (n=16)	1	13	8	5	3	2	1	2	6
Disorder of consciousness (n=28)	1	27	13	10	3	2	0	4	12
Brainstem impairment (n=7)	0	7	4	4	0	1	0	2	3
Cerebellar syndrome (n=5)	1	3	1	1	0	0	0	0	3
Cognitive disorders (n=36)	4	27	21	14	6	4	2	4	11
Frontal syndrome (n=15)	3	9	9	5	3	2	1	3	3
Psychiatric disorders (n=4)	1	4	3	2	1	1	0	1	3
Patients with MRI (n=57)	7	45	29	20	8	5	2	6	17
Unremarkable MRI (n=16)	3	13	8	6	2	1	0	1	5
Hemorrhages (n=21)	3	15	13	9	3	2	0	3	3
Multiple microhemorrhages (n=10)	1	8	8	6	3	2	0	2	1
Corpus callosum injury (n=4)	0	3	4	3	1	0	0	1	1
Acute ischemic lesions (n=13)	2	9	6	3	2	2	1	2	4
Gray matter injury (n=13)	2	10	7	5	1	1	2	2	4
White matter enhancing lesions (n=5)	0	5	4	3	1	1	0	1	0
Basal ganglia abnormalities (n=4)	0	4	1	1	0	0	1	1	1
Hypoxic-ischemic lesions (n=3)	1	2	0	0	0	0	0	0	1
Metabolic abnormalities (n=3)	0	3	1	1	0	0	0	0	3
PRES lesions (n=2)	0	2	1	1	0	1	0	1	1
Leptomeningeal contrast enhancement (n=2)	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Cytotoxic lesion of the corpus callosum (CLOCC) (n=1)	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Perfusion abnormalities (n=20)	2	17	6	4	2	1	1	2	8
Hypoperfusion (n=19)	2	16	6	4	2	1	1	2	7
Hyperperfusion (n=4)	1	3	0	0	0	0	0	0	2

Data are represented as absolute numbers (the number of patients with each EEG findings and clinical or MRI findings).

Annexe 3

Article 8 : Older patients with COVID-19 and neuropsychiatric manifestations: study of risk factors for mortality.

Running head: COVID-19 and neurological or psychiatric conditions.

Authors:

Vi-Huong Nguyen-Michel, MD^{1,2*}, Marion Houot, MSc^{3,4,5}, Cécile Delorme, MD^{3,6}, Aude Sangare, MD^{1,3}, Ana Gales, MD⁷, Valerio Frazzini, MD, PhD^{1,23}, **Aurélié Hanin, PharmD^{1,2,3}**, Djamel Aissani, MD⁸, Bruno Oquendo, MD⁹, Flora Ketz, MD⁹, Carmelo Lafuente-Lafuente, MD, PhD⁹, Christel Oasi, MD⁹, Kiyoka Kinugawa, MD, PhD^{1,10}, Gaëlle Ouvrard, MD¹¹, Renata Ursu, MD¹², Bertrand Degos, MD, PhD¹³, Benjamin Rohaut, MD, PhD^{3,14}, Sophie Demeret, MD¹⁴, Virginie Lambrecq, MD, PhD^{1,2,3}, Vincent Navarro MD, PhD^{1,2,3}, Emmanuel Fournier, MD, PhD^{1,3}, Jean-Christophe Corvol, MD, PhD^{3,6}, Alaina Borden, MD^{1,15}, on behalf of the CoCo-Neurosciences Study Group.

Affiliations

¹Sorbonne Université, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Charles-Foix Hospital Group, Clinical Neurophysiology Department, EEG-Epilepsy Unit, Functional Exploration Unit for the Older patients, Paris, France

²Sorbonne Université, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Epileptology Unit, Paris, France

³Sorbonne Université, Paris Brain Institute – ICM, INSERM, CNRS, Paris, France

⁴Sorbonne Université, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Institut de la Mémoire et de la maladie d'Alzheimer, Paris, France.

⁵Sorbonne Université, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Center of Excellence of Neurodegenerative Disease (CoEN), Paris, France.

⁶Sorbonne Université, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Department of Neurology, Paris, France

⁷Sorbonne Université, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Sleep disorders Unit, Paris, France

⁸Sorbonne Université, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Charles-Foix Hospital Group, Department of Radiology, Paris, France

⁹Sorbonne Université, AP-HP, Charles-Foix Hospital, Geriatric Department, Paris, France

¹⁰Sorbonne Université, CNRS, UMR 8256 Biological Adaption and Aging, Paris, France

¹¹Sorbonne Université, AP-HP, Rothschild Hospital, Neurological Rehabilitation Unit, Paris, France

¹²Université de Paris, AP-HP Nord, Saint-Louis Hospital, Neurological Unit, Paris, France

¹³Sorbonne Université Paris Nord, AP-HP, Avicenne Hospital, Department of Neurology, Bobigny, France

¹⁴Sorbonne Université, Pitié-Salpêtrière Hospital, Neurological Intensive Care Unit, Paris, France

¹⁵ Department of Neurology, Montfermeil Hospital, Montfermeil, France

***Address correspondence to:** Vi-Huong Nguyen-Michel, MD, Département de Neurophysiologie Clinique, Hôpital Pitié-Salpêtrière Charles-Foix, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, Paris 75013,

France. Email: vi-huong.nguyen-michel@aphp.fr

Main text word count: 5157

Number of data elements: 5 (3 tables and 2 figures)

Abstract

Background: Little is known about risk factors for mortality in older patients with COVID-19 and neurological and/or psychiatric conditions.

Methods: We conducted a multicentric retrospective observational study in hospitalized patients aged 70 years or older, with COVID-19 and preexisting neuropsychiatric comorbidities and/or new–neuropsychiatric manifestations. Patients were consecutively recruited from hospitals in the Paris area between April 1 and November 21, 2020. We examined their clinical and paraclinical data and conducted a survival analysis using the Cox proportional-hazards model to determine factors associated with an instantaneous risk of mortality at 40 days after first symptoms of COVID-19.

Results: Out of 191 patients included (median age 80 [interquartile range 74-87]), 136 (71%) had neuropsychiatric comorbidities, 142 (74%) and 50 (26%), respectively, presented a wide spectrum of new neurological and/or psychiatric symptoms, and 121 (63%) developed acute neurological disorders. The mortality rate at 40 days was 19.4%. On univariate analysis, several clinical and paraclinical factors were associated with a higher instantaneous risk of death including neurological factors (brain tumor, Parkinsonism, impaired consciousness). On multivariate analysis, a lower Activities of Daily Living score (HR 0.69; 95% CI 0.58-0.82), a neutrophil to lymphocyte ratio ≥ 9.9 (HR 5.78; 95% CI 2.72-12.2), and thrombocytopenia (HR 5.68; 95% CI 2.73-11.8) independently increased the instantaneous risk of death (all $p < .0001$).

Conclusion: This study adds new findings about risk factors for mortality in older inpatients with COVID-19 and neuropsychiatric conditions. We identified risk factors that are simple to evaluate in routine clinical practice.

Keywords: COVID-19, Neurological disorders, Psychiatric disorders, Risk Factors

Introduction

Advanced age is associated with a high risk of COVID-19 infection and mortality (1-5). Several studies have focused on older adults with COVID-19 including older (≥ 60 or 65 years of age) (6-12), middle old (≥ 70 years) (13-18), very old (≥ 80 years) (19-21), and oldest old (≥ 85 years) (22) patients. These studies had different goals in that they did not always mention neuropsychiatric comorbidities and provided little insight into new neuropsychiatric manifestations during the course of COVID-19. The main neurological symptoms that have been reported in older patients with COVID-19 are anosmia, ageusia, myalgia (7,8,11,13,17,20,22), headache (7,8,12,13,20), and confusion/delirium (7,12,13,15,17-22). Few studies have reported acute neurological disorders including stroke (12,13,21) and seizures (12,21). Encephalopathy was retrospectively reported as the most frequent neurological complication (20%) in a population of older patients with COVID-19 who had died (23). Consequently, little is known about risk factors for mortality in older patients with COVID-19 and preexisting and/or new neuropsychiatric conditions. The relationships between mortality in older patients with COVID-19 and preexisting dementia (6,7,11,13,18,20,21,22) or a history of stroke (6,8,11,13,18,20,22,24) have been reported, but little is known about Parkinsonism (12,13), brain tumors, epilepsy, and depression (6,13), as well as other neuropsychiatric disorders. A study centered on neurovascular complications of COVID-19 in older patients (mean age 85 years) reported that acute stroke did not influence mortality (24).

We learn from early (25-27) and recent studies (28-30) in adult patients with COVID-19, that neuropsychiatric manifestations occurring during COVID-19 infection have a much larger spectrum than previously thought and were associated with severe disease (25,26) and an increased risk of in-hospital mortality (29).

Here, we examined the risk factors for mortality in hospitalized patients aged 70 years or older, with COVID-19 and neurological or psychiatric comorbidities or new neuropsychiatric manifestations, taking into account general and paraclinical findings. These data are lacking, and we hypothesized that the risk factors for mortality in these patients could be different than those in other older patient populations with COVID-19.

Materials and Methods

The study was conducted in accordance with good clinical practice, the French regulation for retrospective studies on clinical data, and was compliant with the European General Data Protection Regulation (GDPR) and the French Commission Nationale de l'Informatique et des

Libertés (CNIL) rules. All patients (or their relatives in case of incapacity) received written information about the research and consented to the use of their data. The study received the approval of the Sorbonne University Ethics Committee (N°2020 CER-202028). The study is registered on the clinicaltrials.gov website (NCT04362930).

The cohort follows the STROBE recommendation ([Supplementary data Method 1](#))

Design study and participants

In April 2020, in response to the worldwide outbreak of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (31), medical teams from multiple hospitals in the Paris area in France created the Cohort COVID-19 Neurosciences (CoCo-Neurosciences) study group in order to establish an ongoing database of adult patients with (i) COVID-19 infection, (ii) preexisting neuropsychiatric comorbidities, (iii) and/or new neuropsychiatric manifestations during the course of COVID-19 (30). The study group was multidisciplinary and consisted mostly of neurologists from all subspecialties within neurology as well as psychiatrists and geriatricians. All items to be included in a standardized electronic data collection form were decided at the start of the study, and treating physicians filled out the CoCo-Neurosciences standardized form at inclusion and as soon as information was available. Covid-19 was defined by at least one of the three following criteria: a) positive SARS-CoV-2 real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) from swab, or positive antibody tests; b) typical chest computed tomography (CT)-scan findings for SARS-CoV-2 infection during the pandemic; c) suspected Covid-19 infection according to WHO guidance criteria (32).

For this study we extracted from the CoCo-Neurosciences cohort patients aged 70 years or older, hospitalized at Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP) hospitals between April 1 and November 21, 2020. We excluded patients under 70 years of age, admitted to hospitals outside of the AP-HP system (because of unavailable direct access to medical records), outpatients, and patients with missing age or gender data.

Data collection

We first used information collected by the CoCo-Neurosciences study group including demographic data, comorbidities and medications, COVID-19 symptoms, new neurological and psychiatric manifestations, specific treatments, outcome, and, when available, results from paraclinical investigations. A group of medical doctors including neurologists and a geriatrician reviewed medical records of each patient, completed missing data when possible, added geriatric data, blood test results, outcome, and further follow-up information about survivors

after hospital discharge, using the most recent available electronic medical records or by phone calls to patients or relatives as of January 2021. A radiologist completed chest CT data when possible. Neurologists reviewed final neurological diagnoses in light of clinical manifestations and specific neurological investigations when available, including cerebrospinal fluid (CSF) analysis, brain imaging by CT or magnetic resonance imaging (MRI), 18-fluorodesoxyglucose-positron emission computed tomography (FDG-PET/CT), electroencephalography (EEG), and electroneuromyography (ENMG).

Outcome and independent variables

The main outcome was the survival time and mortality from COVID-19 at 40 days. Survival time was the number of days from the first symptoms of COVID-19 until death or the end of the 40 day-observation period. The 40-day endpoint was chosen because there were no missing data on death and no loss of follow-up before 40 days, and we believe that 40 days is long enough to reflect the mortality risk related to COVID-19, considering both respiratory and neurological complications.

Independent variables were (1) baseline characteristics (gender, age divided into 10-year subgroups, ethnicity, body mass index (BMI), autonomy (living condition, Activity Daily Living (ADL) score for autonomy, frailty Rockwood score, and mini-mental state examination (MMSE) score), number of comorbidities and medications, anticoagulant treatment at admission; (2) general comorbidities (malnutrition: BMI <21kg/m², obesity: ≥30kg/m², cardiovascular diseases including hypertension, lung diseases including chronic obstructive pulmonary disease, diabetes, current smoking, chronic kidney disease, immunodepression, cancer) and neurological (cognitive impairment, Parkinsonism, cerebrovascular disease, brain tumor, epilepsy, amyotrophic lateral sclerosis, peripheral neuropathy, and others) or psychiatric (depression-anxiety, bipolar disorder, psychosis) comorbidities; (3) symptoms of COVID-19, geriatric symptoms, neurological symptoms, psychiatric symptoms, and neurological disorders occurring during COVID-19; (4) specific treatment administered for COVID-19 (hydroxychloroquine, antiviral therapy, corticosteroid, or immunomodulatory/anticytokine agents), antibiotics, oxygen therapy, treatment for acute hypoxemic respiratory failure, and decision to not initiate resuscitation or to initiate palliative care, intensive care unit (ICU) admission; (5) paraclinical findings including routine and extended blood tests, blood gas and chest CT findings. Definitions and criteria of the studied clinical and paraclinical variables are supplied in [Supplementary data Method 2](#).

Statistical analysis:

Continuous variables are presented as median [interquartile range (IQR)] as they were non-normally distributed using Shapiro-Wilk test. Categorical variables are presented as numbers (percentage).

The Kaplan-Meier estimator was used to compute the survival curve.

Cox proportional-hazards models were used to assess the potential risk factors of death from COVID-19 infection at 40 days after the first symptoms. We first performed univariate analysis on all risk factors. We then selected variables with $p < .1$ from univariate analysis with $<15\%$ of missing data in the non-survivor group to perform a forward stepwise selection and select the three most significant variables to build a multivariate model. This choice was to avoid overfitting in the model because of the limited number of deaths ($n=37$). Missing data were not imputed and are described in tables.

Values of hazard ratio (HR) with a 95% confidence interval (CI) were reported. Variables with p value $<.05$ we considered significant on multivariate analysis. The proportional hazards assumptions of the Cox models were checked using the Schoenfeld residuals test.

Statistical analysis was conducted with STATA^R version 16.1 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

Results**Participants and baseline characteristics**

A total of 191 patients aged 70 years or older (median age 80 [IQR 74-87]) were included. The recruitment details are explained in the flow chart (Figure 1). Of them, 51% were male, 70 % were Caucasian, 17% were >90 years of age. Women were older than men (median age 85 vs 77 years, Wilcoxon- Mann-Whitney $P<0.001$). The median [IQR] ADL score for autonomy was 5.5 [4-6] and frailty Rockwood score was 5 [4-6]. The median [IQR] BMI was 23.7 kg/m² [21-28]. Patients had on median 4 comorbidities and took 6 medications daily. The most prevalent comorbidity was cardiovascular disease (65%), in particular hypertension (51%). Neurological or psychiatric comorbidities represented 71% (136/191) of patients including cognitive impairment (39%), Parkinsonism (6%), cerebrovascular disease (22%), brain tumors (6%), depression-anxiety (29%) and other disorders (see details in Table 1). Laboratory findings included lymphopenia (92%), malnutrition (84%), and anemia (61%) in a majority of patients.

Clinical manifestations and treatment

Table 1 provides details concerning the prevalence of COVID-19 symptoms, geriatric symptoms, new neurological and psychiatric symptoms, and acute neurological disorders. The most frequent symptoms were fever (70%), cough (59%) and dyspnea (57%), fatigue (57%) and delirium (49%). The most frequent new neurological symptoms (n=142, 74%) were cognitive disturbances (23%), consciousness impairment (18%), behavioral disturbance (18%) and of new psychiatric symptoms (n=50, 26%) was depression-anxiety (19%). The most frequent final diagnosis of neurological disorder (n=121, 63%) was encephalopathy (n=116, 61%). Of these 116 patients, toxic-metabolic encephalopathy was suspected in 105 patients. Most patients were treated with antibiotics (74%). Other treatments included corticosteroids (22%), hydroxychloroquine (12%), antiviral treatments (9%), immunomodulatory/anticytokine agents (7%). Oxygen therapy was administered in 73% of patients (median flow [IQR] 4 L/min [2-12]) and treatment for acute hypoxemic respiratory failure was required in 27% of patients. ICU admission was indicated in 15% of patients.

Mortality

At day 40 after onset of COVID-19 symptoms, 37 of 191 patients (19.4%) had died due to COVID-19 following a median [IQR] of 11 days [6-14] (**Figure 2**). The median follow-up [IQR] for survivors was 168 days [106-242] as of January 2021.

Univariate analysis for instantaneous risk factors for death at 40 days

Table 1 presents results about clinical risk factors for death. Preselected clinical variables ($p < .1$) were as follows: male gender, South Asian ethnicity as compared to Caucasian ethnicity, lower ADL score, comorbidities (cancer, brain tumors, Parkinsonism and immunodepression), COVID-19 symptoms (dyspnea and abdominal pain), new neurological symptoms (impaired consciousness), treatments including corticosteroids, oxygen therapy, high-flow oxygen therapy at 15L/min, treatment for acute hypoxemic respiratory failure which were associated with a higher instantaneous risk of death (iRD) (all $p < .05$), and higher Rockwood score ($p = .05$), the absence of cough ($p = .08$) and new neurological disorders (acute encephalopathy) ($p = .09$) which tended to be associated with a higher iRD. The decision not to resuscitate, to initiate palliative care and a shorter length of hospital stay was associated with a higher iRD (both $p < .05$). Thirteen of 18 patients with mechanical ventilation (out of 28 patients admitted to ICU) presented critical illness neuromyopathy. All 13 survived at 40 days and their median follow-up [IQR] was 186 days [148-238].

Table 2 presents results about paraclinical risk factors for death. The best neutrophile to lymphocyte count (N/L) ratio threshold to predict mortality risk was ≥ 9.9 (area under curve 0.7, sensitivity 67%, specificity 76%) and the best lymphocyte count threshold was $< 0.62 \times 10^9/L$ (area under curve 0.7, sensitivity 75%, specificity 59%).

Preselected paraclinical variables ($p < .1$) were as follows: elevated white blood cell (WBC) and neutrophil counts, decreased platelet and lymphocyte counts, the presence of neutrophilia and thrombocytopenia, a lymphocyte count cut-off $< 0.62 \times 10^9/L$, higher N/L ratio, a N/L ratio cut-off of ≥ 9.9 , higher levels of glycemia, sodium, uremia, osmolarity, creatinine, aspartate aminotransferase, serum ferritin, lower level of prothrombin time (in percentage) which were associated with a higher iRD (all $p < .05$), and WBC groups ($p = .08$), higher level of lactate dehydrogenase ($p = .09$), lower levels of serum calcium adjusted ($p = .05$), glomerular filtration rate ($p = .07$), and partial pressure of oxygen (PaO₂) values ($p = .06$) which tended to be associated with a higher iRD.

Of note, a lymphocyte count cut-off $< 0.62 \times 10^9/L$ was strongly associated with iRD ($p < .001$) but its classic reference value $< 1.5 \times 10^9/L$ was not at all ($p = .26$).

Multivariate analysis

For forward stepwise analysis, we explain the exclusion of variables or choice of variables from the same category in [Supplementary data Result](#).

Selected variables from forward stepwise analysis ($p < .05$) were as follow: male gender, South Asian ethnicity, ADL score, brain tumor, dyspnea, abdominal pain, impaired consciousness, a N/L ratio ≥ 9.9 , and thrombocytopenia. The three most significant variables were included in the final multivariate which independently associated with higher iRD (all $p < .0001$): lower ADL scores (HR 0.69; 95% CI 0.58-0.82), a N/L ratio ≥ 9.9 (HR 5.78; 95% CI 2.72-12.2) and thrombocytopenia HR 5.68; 95% CI 2.73-11.8) (**Table 3**).

The test of proportional hazards assumption using the Schoenfeld residuals test validated the model ($p = .17$) with a total number of patients of 183/191 used in the model.

Discussion

In our study, the mortality rate was 19.4% at 40 days in inpatients aged 70 years or older with COVID-19 and neurological and/or psychiatric comorbidities and/or new neuropsychiatric manifestations. On univariate analysis, several variables were found to be associated with a

higher iRD including brain tumor, Parkinsonism, consciousness impairment. On multivariate analysis, lower ADL scores for autonomy, a N/L ratio ≥ 9.9 , and thrombocytopenia were independently associated with a higher iRD.

Mortality

The mortality rate in our study appears lower than that reported between 24% and 47 % in other geriatric cohorts (13,16,20,21), or even exceeding 80% (4) in subgroups of patients aged 70 years or older from adult cohorts, but our patients had different characteristics than other cohorts of older populations. Compared to a large cohort of French patients (≥ 70 years of age) from acute geriatric wards (13), our population recruited from different wards, appeared younger, had higher ADL scores for autonomy. Our recruitment of patients with neuropsychiatric conditions excluded patients with severe non-neurological COVID-19 complications. Only 9% of our older patients were initially in nursing homes, as compared to 29% in a geriatric cohort (13). Older patients in nursing homes with advanced neurological comorbidities, particularly dementia, and severe COVID-19 might not have been transferred to hospital, especially during the first wave of the pandemic.

Neurological and psychiatric comorbidities

We found that brain tumors (mostly glioblastoma and primary central nervous system lymphoma) in our older patients were associated with a higher iRD, as were immunodepression and cancer on univariate analysis (all $p < .05$) and brain tumors remained significant after stepwise analysis ($p = .01$). These medical conditions were active in our older patients who were often undergoing chemotherapy, which might impact their overall condition and explain their poorer outcome with COVID-19. Previous cohorts examining cancer/malignity in older, very old or oldest old patients (8,9,11,13,21,22) failed to show any association with death, but it should be noted that cancer was less prevalent from 4.4 to 13% (mean 9.7%) in these studies as compared to our cohort (18.3%). and brain tumors were not individually mentioned in these studies. Our recruitment clearly explains this difference as brain tumors are less prevalent than other neurological comorbidities in older patients, and patients with brain tumors are more likely to be cared for in a specialized neurooncological center as the Salpêtrière Hospital. Another specific geriatric population recruited from an emergency department also showed an association between malignity and death (20).

Parkinsonism-related pathology may lead to rigidity of certain respiratory muscles which impairs the cough reflex, therefore contributing to the poor prognosis in patients with SARS-

CoV-2. We found that Parkinsonism was associated with a higher iRD, and the absence of cough trended towards an association on univariate analysis. A review article focusing on the relationship between SARS-CoV-2, COVID-19, and Parkinson's disease included studies with conflicting results, and mortality rates ranged from 5.2 to 100% (33). The UK biobank cohort showed Parkinson's disease patients (n= 142, 50 years of age or older) have a higher risk of SARS-CoV-2 infection but not of mortality from COVID-19 (34). Patients with advanced Parkinson's disease appear to be particularly vulnerable (33) and our older patients with Parkinsonism (mean age 79 years) may be more likely to have an advanced form of the disease. However, geriatric study did not find an association between Parkinson's disease and mortality (13) and Parkinsonism was associated with a higher iRD in our study but not independently. Further studies with large cohorts of Parkinson's geriatric patients considering advanced form of the disease are needed.

Preexisting dementia is the most prevalent neurological comorbidity in our cohort as it was in a large COVID-19 geriatric cohort of patients aged 70 years or older (13). Some studies in older or very old patients with COVID-19 showed an association between dementia (6,20) or Alzheimer disease (34) and mortality while our study and others did not (7,13,18,21). Canevelli et al (35) found among patients who died from COVID-19 in their cohort, patients with dementia were less likely to receive supportive therapies and intensive care and had faster clinical worsening than patients without dementia.

Of note, cases of amyotrophic lateral sclerosis were rare (n=2 in our cohort) and both patients died in a very short time (4 and 5 days), suggesting these patients are particularly vulnerable to severe forms of COVID-19.

Preexisting depression represented 29% of our patients and was not associated with mortality, as it was in a large geriatric cohort of patients aged 70 years or older (13). Conversely, large cohort of 269,070 community volunteers aged 65 years or older with 507 COVID-19 inpatients showed an association between preexisting depression and mortality, but the authors suggested further studies to examine whether the association is due to the depression itself or rather to other physical disorders (6).

New neurological and psychiatric symptoms

A wide spectrum of new neurological symptoms including anosmia, dysgeusia, myalgia, headache, dizziness, sensory symptoms, motor deficit, movement disorder, behavioral and cognitive disturbance, gait impairment, impaired consciousness, and swallowing impairment and new psychiatric symptoms including mood disturbance, anxiety, psychosis, sleep

disturbance, catatonia were observed during the COVID-19 in our older patients (Table 1). Among these symptoms, only impaired consciousness (18%) was associated with an iRD on univariate and stepwise analysis (both $p < .05$). Previous studies rarely examined this symptom individually in older patients with COVID-19. One study reported a prevalence of 10.5% (mean age 85 years) (17) and another found its association with mortality but not independently (median age 67 years) (10).

Acute neurological disorders

Acute encephalopathy was the most frequent new neurological disorder diagnosed in adult cohorts with COVID-19 (from 43 to 51%) (29,30) and in our older patients (61%). In most our cases of encephalopathy, clinical and paraclinical results suggested a toxic-metabolic origin. Patients with encephalopathy may exhibit hypometabolism on brain FDG-PET even without significant abnormalities on brain MRI and CSF (36), lasting at least 6 months (37), and may improve after immunotherapy (36, 37). We may thus have underestimated other causes of encephalopathy in our patients. Encephalopathy was the most frequent neurological complications in older patients who died from COVID-19 (20%) (23) and tended to be associated with a higher iRD in our study on univariate analysis ($p < .1$). One study in adult patients found that neurological disorders were associated with a higher risk of mortality but did not distinguish the potential role of each disorder (29). A mixed (outpatients and inpatients) cohort of adult patients with COVID-19 and *de novo* neuropsychiatric manifestations showed that encephalopathy was associated with higher risk of mortality (30).

Other new neurological disorders found during COVID-19 infection in this study were not associated with a higher iRD. Stroke complication represented 0.4% of 821 patients geriatric patients (13), 2.4% of 125 patients with dementia (12) and 4% of patients in other older population (24) with COVID-19. Our population extracted from the CoCo-Neurosciences cohort, showed a higher prevalence (6.3%) of cerebrovascular disease, but, in line with previous studies, we found that acute stroke did not increase the iRD.

Regarding COVID-19-associated encephalitis, Ellul et al (38) selected 8 adult cases for their review. Of these 8 patients, two were aged over 70 years, one of which required intubation and ventilation and died. The other did not need oxygen support, received other treatments and improved. Out of 10 cases with known age selected by Lv et al (39) for their review, two oldest patients (>70 years of age) died while younger patients had favorable outcomes. Pilotto et al (40) reported 25 cases from a multicentric study with 44% (11/25) of patients aged 70 years or older. Poor outcome was associated with MRI alterations and two of 11 older patients died.

We added here six middle-old patients (mean age 78.6 years, range 70-92) in whom the hypothesis of encephalitis was supported by clinical and brain MRI (n=5) and/or 18F-FDG-PET (n=2) and/or CSF (n=2) and/or EEG (n=3) while negative RT-PCR in CSF in all six cases suggests a secondary postinfectious, inflammatory mediated encephalitis (38). The oldest patient (92 years) had severe complications, received palliative care and died on day 11 of illness. Five other patients survived at 40 days, in particularly 4 of them clearly improved after treatment with immunomodulatory agents (mean follow-up 9 months). Detecting these cases is therefore crucial in a geriatric setting to not limit care for a treatable condition.

We identified one case of Guillain-Barré syndrome who survived at 40 days. Only 3 cases were found in a large cohort of adult patients (29) and five from the Coco-Neurosciences adult cohort (31). A recent comprehensive review collected 73 COVID-19 cases with Guillain-Barré syndrome with a broad age range (11-94 years), and 15 cases were 70 years or older. The review found a less favorable outcome was associated with a significantly older age (41).

Paraclinical findings

Our most important paraclinical finding was the strongest and independent association of the N/L ratio ≥ 9.9 with a higher iRD (HR=5.78, 95% CI 2.72-12.2, $p < .0001$). This variable is particularly simple to use because a blood cell count is the basis of any entry blood workup, and the ratio is rapid to calculate. Moreover, its robust value to predict severity and mortality of COVID-19 was demonstrated in several adult cohorts (42-46). A high N/L ratio reflects an increased inflammatory response or an immunity imbalance or a combination of the two. The ratio may remain significant to predict the mortality risk in inpatients with COVID-19 even when neutrophil or lymphocyte counts alone (44, 46) do not. The N/L ratio has been rarely studied in older populations. One study using this ratio in patients aged 70 years or older and showed that with higher N/L ratio, there was an increase in likelihood of death, but this study included few symptoms of COVID, no neurological symptoms and only two biological variables (C-reactive protein (CRP) and N/L ratio) (15). Here, we showed that N/L ratio ≥ 9.9 predicted an increased iRD, independently of several other neurological and non-neurological variables. Interestingly, Liao et al (42) have found a similar cut-off value of N/L ratio (> 9.13) to predict death in adult patients with COVID-19.

Lymphocyte count was associated with a higher iRD while lymphopenia $< 1.5 \times 10^9/L$ was not with 92% of our patients exhibited lymphopenia. A lower threshold of lymphopenia $< 0.8 \times 10^9/L$ significantly predicted mortality in older (7) or very old patients (21). We found that a lymphocyte count cut-off of $< 0.62 \times 10^9/L$ was strongly associated with a higher iRD (HR 3.44,

95% CI 1.73-6.80, $p < .001$). Moreover, the median lymphocyte count value was very low in non-survivors between 0.51 and $0.57 \times 10^9/L$ in our study and in other older populations (8,10). We suggest that when evaluating the severity and risk of mortality in older patients with COVID-19, clinicians should consider a lower lymphocyte count threshold.

Another important finding in this study is the strong and independent association of thrombocytopenia with the iRD (HR= 5.68, 95% CI 2.73-11.8, $p < .0001$) and lower prothrombin time (expressed in percentage) was associated with a higher iRD on univariate analysis ($p = .04$). These findings echo the results in a study in adult population with COVID-19 (42) where a similar coagulopathy profile was associated with mortality. Other studies in older or oldest old patients (7,11-13,22) did not show any association between platelet count and mortality, with one exception where a significant decrease in platelets was found in non survivors (8). Coagulation laboratory markers vary greatly over the course of COVID-19 (42) which may explain these conflicting results as markers may have been tested at different points during the disease.

Specific marker values (NT-Pro-BNP, Hypersensitive cardiac Troponin T, D-Dimer) were not associated with a higher risk of iRD in this study, but there were substantial missing data (Table 2). However, Ponsford et al (47) demonstrated that specific extended blood tests did not provide significant additional predictive value in patients with COVID-19, compared to core routine blood tests. Results of this study may apply to older adults as the median age of the cohort was 63 years and 81 years for non survivors.

Chest CT findings were not associated with iRD in our study as in some previous studies (7,22) while other studies showed specific anomalies of COVID-19 (13) or consolidation features (20) or unilateral-bilateral infiltrates (21) were associated with mortality.

Other factors

Our findings are consistent with previous studies in older patients where lower ADL score (13,20), male gender (13,19,21, 22), and dyspnea symptoms (9,13,15,22) were associated with a higher iRD (on univariate and after stepwise analysis, all $p < .05$) and ADL score was selected as one the most associated factors which independently predicted a higher iRD ($p < .0001$). Ethnicity was rarely examined in previous geriatric cohorts. We found South Asian ethnicity was associated with a higher iRD (on univariate and after stepwise analysis, both $p < .05$). One study in older patients (≥ 70 years of age) (14) and another in a large cohort of adults with COVID-19 (48) support our finding about the association of South Asian ethnicity and risk of death, compared to Caucasian ethnicity.

Abdominal pain was associated with a higher iRD (on univariate and after stepwise analysis, both $p < .05$). Previous studies in older patients with COVID-19 which examined abdominal pain symptoms (7,10,13) did not find any association with death. A meta-analysis (n= 6,064, all ages) showed an association between abdominal pain and severe COVID-19 and pointed out that patients with gastrointestinal involvement often had delayed diagnosis (49).

Patients who needed oxygen therapy and treatment for acute hypoxemic respiratory failure had a higher iRD while none of the specific treatments including hydroxychloroquine, antiviral therapies, or immunomodulatory/anticytokine agents were associated with outcome, in line with previous cohorts (12,13,22). The current study and two others in older (13) and very old (21) patients showed a significant association of corticosteroid therapy and death, but we agree that these findings must be interpreted with caution due to different patient profiles and the use of corticosteroids in case of worsening of respiratory symptoms (13).

Strengths and limitations

To the best of our knowledge, this is the first study to examine the risk factors for mortality in older inpatients with COVID-19 while considering neuropsychiatric conditions, together with general and paraclinical findings. While our population does not represent a general geriatric population, our findings may be useful for older patients seen in neurological and psychiatric or specific geriatric settings. The sample size is still relatively small and did not allow for us to include all possible independent variables into a multivariate analysis. Many missing paraclinical data did not allow for further analysis of extended biological markers. Data were retrospectively collected which can lead to bias.

Conclusion

Our study in older patients with COVID-19 and preexisting neuropsychiatric comorbidities and/or new neuropsychiatric manifestations, recruited from the CoCo-Neurosciences cohort provides new findings about the risk factors for mortality taking into account a large spectrum of neuropsychiatric manifestations, together with general and paraclinical findings, and we identified relevant clinical (lower ADL scores for autonomy) and paraclinical (a N/L ratio ≥ 9.9 , thrombocytopenia) risk factors which are simple to evaluate in clinical practice.

Funding

This work was supported by the Fédération Internationale de l'Automobile (FIA) Foundation and donors of Paris Brain Institute – ICM for the Cohort COVID-19 Neurosciences (CoCo-Neurosciences), a grant from Fondation de France (n°00113315). The research leading to these results received funding from the program “*Investissements d’avenir*” ANR-10- IAIHU-06.

Conflict of interest

C.D. received a research grant from the FIA, travel funding from Merz Pharma, Boston Scientific and Medtronic.

V.N. served as board member for UCB pharma, LivaNova, GW pharma et EISAI.

J.-C. C. received a grant from the Fondation de France (#00113315) for the support of this study; and served on the scientific advisory boards for Biogen, UCB, Prevail Therapeutic, Idorsia, Ever Pharma, Denali, and has received grants from the Michael J Fox Foundation and Sanofi outside of this work.

B.D. has received research support from Orkyn, Elivie, Merz, honoraria for speeches from Ipsen, and travail grant from Orkyn

The other authors declare no potential financial conflict

Acknowledgment

The authors thank the CoCo-Neurosciences study group for their participation in the data collection.

Steering Committee (Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris): Cecile Delorme, Jean-Christophe Corvol, Jean-Yves Delattre, Catherine Lubetzki, Stephanie Carvalho, Aurelie Fekete, Sandrine Sagnes. **Scientific Committee** (Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris): Bruno Dubois, Vincent Navarro, Celine Louapre, Tanya Stojkovic, Ahmed Idbaih, Charlotte Rosso, David Grabli, Ana Zenovia Gales, Bruno Millet, Benjamin Rohaut, Eleonore Bayen, Sophie Dupont, Gaelle Bruneteau, Stephane Lehericy, Danielle Seilhean, Alexandra Durr, Aurelie Kas, Foudil Lamari, Marion Houot, Vanessa Batista Brochard. **Principal investigators:** Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris): Sophie Dupont, Catherine Lubetzki, Danielle Seilhean, Pascale Pradat-Diehl, Charlotte Rosso, Khe Hoang-Xuan, Bertrand Fontaine, Lionel Naccache, Philippe Fossati, Isabelle Arnulf, Alexandra Durr, Alexandre Carpentier, Stephane Lehericy, Yves Edel; Foch Hospital (Suresnes): Anna Luisa Di Stefano; Rothschild Hospital (Paris): Gilberte Robain,

Philippe Thoumie; Avicenne Hospital (Bobigny): Bertrand Degos; Sainte-Anne Hospital (Paris): Tarek Sharshar; Saint-Antoine Hospital (Paris): Sonia Alamowitch, Emmanuelle Apartis-Bourdieu, Charles-Siegfried Peretti; Saint-Louis Hospital (Paris): Renata Ursu; Tenon Hospital (Paris): Nathalie Dzierzynski; Charles Foix Hospital (Ivry): Kiyoka Kinugawa Bourron, Joel Belmin, Bruno Oquendo, Eric Pautas, Marc Verny. **Co-investigators**: Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris): Cecile Delorme, Jean-Christophe Corvol, Jean-Yves Delattre, Yves Samson, Sara Leder, Anne Leger, Sandrine Deltour, Flore Baronnet, Ana Zenovia Gales, Stephanie Bombois, Mehdi Touat, Ahmed Idbaih, Marc Sanson, Caroline Dehais, Caroline Houillier, Florence Laigle-Donadey, Dimitri Psimaras, Agusti Alenton, Nadia Younan, Nicolas Villain, David Grabli, Maria del Mar Amador, Gaëlle Bruneteau, Celine Louapre, Louise-Laure Mariani, Nicolas Mezouar, Graziella Mangone, Aurelie Meneret, Andreas Hartmann, Clement Tarrano, David Bendetowicz, Pierre-François Pradat, Michel Baulac, Sara Sambin, François Salachas, Nadine Le Forestier, Phintip Pichit, Florence Chochon, Adele Hesters, Bastien Herlin, An Hung Nguyen, Valerie Procher, Alexandre Demoule, Elise Morawiec, Julien Mayaux, Morgan Faure, Claire Ewencyk, Giulia Coarelli, Anna Heinzmann, Perrine Charles, Tanya Stojkovic, Marion Masingue, Guillaume Bassez, Giorgia Querin, Vincent Navarro, Isabelle An, Yulia Worbe, Virginie Lambrecq, Rabab Debs, Esteban Munoz Musat, Timothee Lenglet, Virginie Lambrecq, Aurelie Hanin, Lydia Chougar, Nathalia Shor, Nadya Pyatigorskaya, Damien Galanaud, Delphine Leclercq, Sophie Demeret, Benjamin Rohaut, Albert Cao, Clemence Marois, Nicolas Weiss, Salimata Gassama, Loic Le Guennec, Vincent Degos, Alice Jacquens, Thomas Similowski, Capucine Morelot-Panzini, Jean-Yves Rotge, Bertrand Saudreau, Bruno Millet, Victor Pitron, Nassim Sarni, Nathalie Girault, Redwan Maatoug, Ana Zenovia Gales, Smaranda Leu, Eleonore Bayen, Lionel Thivard, Karima Mokhtari, Isabelle Plu; Sainte-Anne Hospital (Paris): Bruno Gonçalves; Saint-Antoine Hospital (Paris): Laure Bottin, Marion Yger; Rothschild Hospital (Paris): Gaëlle Ouvrard, Rebecca Haddad, Paulina Cunha, Edouard Januel. Charles Foix Hospital (Ivry): Flora Ketz, Carmelo Lafuente, Christel Oasi, Vi-Huong Nguyen-Michel. **Other Contributors**: **Associated centers** (Lariboisière Hospital, Paris): Bruno Megabarne, Dominique Herve; **Clinical Research Associates** (ICM, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris): Amandine Hippolyte, Aurelie Fekete, Hugo Royer, Camille Minelli, Haysam Salman, Armelle Rametti-Lacroux, Alize Chalançon, Anais Herve, Florence Beauzor, Valentine Maheo, Christelle Laganot, Abel Grine, Marie Biet, Rania Hilab, Aurore Besnard, Meriem Bouguerra, Gwen Goudard, Saida Houairi, Saba Al-Youssef, Christine Pires, Anissa Oukhedouma, Katarzyna Siuda-Krzywicka, Tal Seidel Malkinson; (Saint-Louis Hospital, Paris): Hanane Agguini; (Foch Hospital, Suresnes): Hassen

Douzane; **Data Manager** (ICM, Paris): Avigaelle Abitbol, Safia Said; **Statistician** (ICM, Paris): Marion Houot.

Author Contributions

C.D. and J.-C.C. were responsible for supervision of data collection and data management.

V.-H.N.-M., C.D., J.-C.C., A.B. designed the study, had full access to all data in the study, and takes responsibility for the integrity and accuracy of the data analysis.

V.-H.N.-M., C.D., J.-C.C., A.B., A.S., A.G., V.F., A.H., D.A., B.O., F.K., C.L.-L., C.O., K.K., G.O., R.U., B.D., B.R., S.D., V.L., V.N., E.F. contributed to data acquisition and data interpretation.

V.-H.N.-M. conducted statistical analysis and M.H. supervised the statistical method and results.

V.-H.N.-M., M.H., and A.B. were responsible for literature search

V.-H.N.-M. wrote the manuscript and M.H., C.D., J.-C.C., and A.B. advised and improved.

All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

The corresponding author attests that all listed authors meet authorship criteria and that no others meeting the criteria have been omitted.

References

1. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395:1054-1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
2. Cummings MJ, Baldwin MR, Abrams D, et al. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet*. 2020;395:1763-1770. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31189-2.
3. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City Area. *J Am Med Assoc*. 2020;323:2052–2059. doi:10.1001/jama.2020.6775
4. Abbatecola AM, Antonelli-Incalzi R. Editorial: COVID-19 Spiraling of Frailty in Older Italian Patients. *J Nutr Health Aging*. 2020;24:453-455. doi: 10.1007/s12603-020-1357-9.
5. Khan MS, Dogra R, Miriyala LKV, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) at Mercy Health Hospitals, Toledo, Ohio. *PLoS One*. 2021;16:e0250400. doi: 10.1371/journal.pone.0250400. eCollection 2021.
6. Atkins JL, Masoli JAH, Delgado J, et al. Preexisting Comorbidities Predicting COVID-19 and Mortality in the UK Biobank Community Cohort. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020;75:2224-2230. doi: 10.1093/gerona/glaa183.
7. Steinmeyer Z, Vienne-Noyes S, Bernard M, et al. Acute Care of Older Patients with COVID-19: Clinical Characteristics and Outcomes. *Geriatrics (Basel)*. 2020;5:65. doi: 10.3390/geriatrics5040065.
8. Wang L, He W, Yu X, et al. Coronavirus disease 2019 in elderly patients: Characteristics and prognostic factors based on 4-week follow-up. *J Infect*. 2020;80:639-645. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.019.
9. Li P, Chen L, Liu Z, et al. Clinical features and short-term outcomes of elderly patients with COVID-19. *Int J Infect Dis*. 2020;97:245-250. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.107.
10. Sun H, Ning R, Tao Y, et al. Risk Factors for Mortality in 244 Older Adults With COVID-19 in Wuhan, China: A Retrospective Study. *J Am Geriatr Soc*. 2020;68:E19-E23. doi: 10.1111/jgs.16533.
11. Neumann-Podczaska A, Chojnicki M, Karbowski LM, et al. Clinical Characteristics and Survival Analysis in a Small Sample of Older COVID-19 Patients with Defined 60-Day Outcome. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17:8362. doi: 10.3390/ijerph17228362.

12. Vrillon A, Mhanna E, Aveneau C, et al. COVID-19-19 in adults with dementia: clinical features and risk factors of mortality-a clinical cohort study on 125 patients. *Alzheimers Res Ther.* 2021;13:77. doi: 10.1186/s13195-021-00820-9.
13. Zerah L, Baudouin É, Pépin M, et al. Clinical Characteristics and Outcomes of 821 Older Patients With SARS-Cov-2 Infection Admitted to Acute Care Geriatric Wards. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2021;76:e4-e12. doi: 10.1093/gerona/glaa210.
14. Miles A, Webb TE, Mcloughlin BC, et al. Outcomes from COVID-19 across the range of frailty: excess mortality in fitter older people. *Eur Geriatr Med.* 2020;11:851-855. doi: 10.1007/s41999-020-00354-7.
15. Knopp P, Miles A, Webb TE, et al. Presenting features of COVID-19 in older people: relationships with frailty, inflammation and mortality. *Eur Geriatr Med.* 2020;11:1089-1094. doi: 10.1007/s41999-020-00373-4.
16. Hägg S, Jylhävä J, Wang Y, et al. Age, Frailty, and Comorbidity as Prognostic Factors for Short-Term Outcomes in Patients With Coronavirus Disease 2019 in Geriatric Care. *J Am Med Dir Assoc.* 2020;21:1555-1559.e2. doi: 10.1016/j.jamda.2020.08.014.
17. Annweiler C, Sacco G, Salles N, et al. National French Survey of Coronavirus Disease (COVID-19) Symptoms in People Aged 70 and Over. *Clin Infect Dis.* 2021;72:490-494. doi: 10.1093/cid/ciaa792.
18. Graham NSN, Junghans C, Downes R, et al. SARS-CoV-2 infection, clinical features and outcome of COVID-19-19 in United Kingdom nursing homes. *J Infect.* 2020;81:411-419. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.073.
19. Karlsson LK, Jakobsen LH, Hollensberg L, et al. Clinical presentation and mortality in hospitalized patients aged 80+ years with COVID-19-19-A retrospective cohort study. *Arch Gerontol Geriatr.* 2021;94:104335. doi:10.1016/j.archger.2020.104335.
20. Covino M, De Matteis G, Polla DAD, et al. Predictors of in-hospital mortality AND death RISK STRATIFICATION among COVID-19 PATIENTS aged 80 YEARS OLD. *Arch Gerontol Geriatr.* 2021:104383. doi: 10.1016/j.archger.2021.104383.
21. Ramos-Rincon JM, Buonaiuto V, Ricci M, et al. Clinical Characteristics and Risk Factors for Mortality in Very Old Patients Hospitalized With COVID-19 in Spain. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2021;76:e28-e37. doi: 10.1093/gerona/glaa243.
22. Vrillon A, Hourregue C, Azuar J, et al. COVID-19-19 in Older Adults: A Series of 76 Patients Aged 85 Years and Older with COVID-19-19. *J Am Geriatr Soc.* 2020;68:2735-2743. doi: 10.1111/jgs.16894.

23. Martín-Jiménez P, Muñoz-García MI, Seoane D, et al. Cognitive Impairment Is a Common Comorbidity in Deceased COVID-19 Patients: A Hospital-Based Retrospective Cohort Study. *J Alzheimers Dis.* 2020;78:1367-1372. doi: 10.3233/JAD-200937.
24. Mendes A, Herrmann FR, Genton L, et al. Incidence, characteristics and clinical relevance of acute stroke in old patients hospitalized with COVID-19. *BMC Geriatr.* 2021;21:52. doi: 10.1186/s12877-021-02006-2.
25. Zhao Y, Wang F, Dong G, Sheng Q, Feng S. A disease progression prediction model and nervous system symptoms in coronavirus disease 2019 patients. *Am J Transl Res.* 2020;12:8192-8207. eCollection 2020.
26. Mao L, Jin H, Wang M, et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020;77:683-690. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.1127.
27. Paterson RW, Brown RL, Benjamin L, et al. The emerging spectrum of COVID-19 neurology: clinical, radiological and laboratory findings. *Brain.* 2020;143:3104-3120. doi: 10.1093/brain/awaa240.
28. Meppiel E, Peiffer-Smadja N, Maury A, et al. Neurologic manifestations associated with COVID-19: a multicentre registry. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27:458-466. doi: 10.1016/j.cmi.2020.11.005.
29. Frontera JA, Sabadia S, Lalchan R, et al. A Prospective Study of Neurologic Disorders in Hospitalized Patients With COVID-19 in New York City. *Neurology.* 2021;96:e575-e586. doi: 10.1212/WNL.0000000000010979.
30. Delorme C, Houot M, Rosso C, et al. The wide spectrum of neuropsychiatric complications in Covid-19 patients with a multidisciplinary hospital context. *Brain Communication.* 2021. *Article in press.*
31. WHO. Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19—11 March 2020. Available online: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-themedia-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (accessed on 25 April 2020).
32. WHO. Coronavirus Disease (COVID-19) Situation Reports [online]. 2020. Accessed at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>. Accessed June 28, 2020.
33. Fearon C, Fasano. A Parkinson's Disease and the COVID-19 Pandemic. *J Parkinsons Dis.* 2021;11:431-444. doi: 10.3233/JPD-202320.

34. Yu Y, Travaglio M, Popovic R, Leal NS, Martins LM. Alzheimer's and Parkinson's Diseases Predict Different COVID-19 Outcomes: A UK Biobank Study. *Geriatrics (Basel)*. 2021;6:10. doi:10.3390/geriatrics6010010
35. Canevelli M, Palmieri L, Raparelli V, et al. Prevalence and clinical correlates of dementia among COVID-19-related deaths in Italy. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2020 Nov 14;12:e12114. doi: 10.1002/dad2.12114. eCollection 2020.
36. Delorme C, Paccoud O, Kas A, et al. COVID-19-related encephalopathy: a case series with brain FDG-positron-emission tomography/computed tomography findings. *Eur J Neurol*. 2020;27:2651-2657. doi: 10.1111/ene.14478.
37. Kas A, Soret M, Pyatigorskaya N, et al. The cerebral network of COVID-19-related encephalopathy: a longitudinal voxel-based 18F-FDG-PET study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021:1-15. doi: 10.1007/s00259-020-05178-y.
38. Ellul MA, Benjamin L, Singh B, et al. Neurological associations of COVID-19-19. *Lancet Neurol*. 2020;19:767-783. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30221-0.
39. Lv P, Peng F, Zhang Y, et al. COVID-19-associated meningoencephalitis: A care report and literature review. *Exp Ther Med*. 2021;21:362. doi: 10.3892/etm.2021.9793.
40. Pilotto A, Masciocchi S, Volonghi I, et al. Presentation and Outcomes of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Related Encephalitis: The ENCOVID Multicenter Study. *J Infect Dis*. 2021;223:28-37. doi: 10.1093/infdis/jiaa609.
41. Abu-Rumeileh S, Abdelhak A, Foschi M, Tumani H, Otto M. Guillain-Barre syndrome spectrum associated with COVID-19: an up-to-date systematic review of 73 cases. *J Neurol*. 2021;268:1133-1170. doi: 10.1007/s00415-020-10124-x.
42. Liao D, Zhou F, Luo L, et al. Haematological characteristics and risk factors in the classification and prognosis evaluation of COVID-19: a retrospective cohort study. *Lancet Haematol*. 2020;7:e671-e678. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30217-9.
43. Liu L, Zheng Y, Cai L, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, a critical predictor for assessment of disease severity in patients with COVID-19. *Int J Lab Hematol*. 2021;43:329-335. doi: 10.1111/ijlh.13374.
44. Wang S, Fu L, Huang K, Han J, Zhang R, Fu Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio on admission is an independent risk factor for the severity and mortality in patients with coronavirus disease 2019. *J Infect*. 2021;82:e16-e18. doi: 10.1016/j.jinf.2020.09.022.
45. Yan X, Li F, Wang X, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio as prognostic and predictive factor in patients with coronavirus disease 2019: A retrospective cross-sectional study. *J Med Virol*. 2020;92:2573-2581. doi: 10.1002/jmv.26061.

46. Liu Y, Du X, Chen J, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J Infect.* 2020;81:e6-e12. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.002.
47. Ponsford MJ, Burton RJ, Smith L, et al. Examining the utility of extended laboratory panel testing in the emergency department for risk stratification of patients with COVID-19: a single-centre retrospective service evaluation. *J Clin Pathol.* 2021;jclinpath-2020-207157. doi: 10.1136/jclinpath-2020-207157.
48. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature.* 2020;584:430-436. doi: 10.1038/s41586-020-2521-4.
49. Mao R, Qiu Y, He JS, et al. Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5:667-678. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30126-6.

Table 1: Univariate Analysis for Instantaneous risk of Death at 40 days according to Demographic, Comorbidities, Symptoms, and Treatments Findings in 191 Older inpatients with Covid-19 and Neuropsychiatric conditions

Variables	Vital status at 40 days			Hazard ratio (95%, CI)	p Value	Missing values
	Total N=191 (100)	Survivor n=154 (80.6)	Non-survivor n=37 (19.4)			
Age	80 [74-87]	79.5 [74-87]	82.5 [76-88]	1.02 [0.97-1.06]	.472	0
Age groups					.510	
70-80	97 (50.8)	81 (52.6)	16 (43.2)	Ref.		
81-90	62 (32.5)	47 (30.5)	15 (40.5)	1.52 (0.75-3.10)	.242	
91-100	32 (16.7)	26 (16.9)	6 (16.2)	1.17 (0.46-3.00)	.740	
Male gender	97 (50.8)	71 (46.1)	26 (70.2)	2.48 (1.22-5.01)	.012*	0
Ethnic origin					.048*	15 (10;5)
Caucasian	123 (69.9)	100 (69.4)	23(71.8)	Ref.		
North African	30 (17.0)	28 (19.4)	2 (6.3)	0.32 (0.75-1.35)	.120	
Sub-Saharan African	7 (3.97)	6 (4.17)	1 (3.12)	0.71 (0.09-5.24)	.735	
South Asian	8 (4.54)	3 (2.08)	5 (15.6)	3.52 (1.33-9.30)	.011*	
Caribbean	4 (2.27)	4 (2.78)	0	NA		
Others	4 (2.27)	3 (2.08)	1 (3.12)	1.22 (0.16-9.10)	.844	
BMI, kg/m2	23.7 [21-28]	23.7 [21-28]	24.7 [20.2-27.4]	0.98 (0.92-1.04)	.602	33 (25;8)
Numbers of comorbidities	4 [3-7]	4 [3-6]	4 [3-7]	0.97 (0.86-1.08)	.575	0
Number of medications	6 [3-8]	6 [3-8]	6 [4-8]	1.03 (0.95-1.12)	.486	2 (1;1)
Anticoagulant treatment	46 (24.2)	34 (22.2)	12 (32.4)	1.60 (0.80-3.15)	.189	1 (1;0)
Autonomy						
Living conditions					.353	
Own home	118 (61.8)	97 (63.0)	21 (56.8)	Ref.		0
Nursing home	18 (9.42)	12 (7.8)	6 (16.2)	2.01 (0.81-5.00)	.131	
Hospitalized ^a	55 (28.8)	45 (29.2)	10 (27.0)	1.00 (0.47-2.14)	.982	
Activity Daily Living score	5.5 [4-6]	6 [4-6]	4.7 [1.7-6]	0.78 (0.67-0.92)	.002*	2 (1;1)
Frailty Rockwood score	5 [4-6]	4 [3-6]	5.5 [4-6]	1.28 (1.00-1.65)	.051*	6 (3;3)
MMSE score	22 [17-27]	22 [16-27]	21.5 [19-24.5]	0.99 (0.87-1.12)	.872	125 (97;28)
Comorbidities						
Malnutrition BMI ≤21kg/m2	42 (26.4)	32 (23.5)	10 (32.2)	1.40 (0.66-2.94)	.385	23 (18;5)
Obesity BMI ≥30 kg/m2	25 (15.8)	21 (16.3)	4 (13.3)	0.83 (0.29-2.38)	.730	32 (25;7)
Cardiac disease	125 (65.4)	102 (66.2)	23 (62.1)	0.85 (0.44-1.65)	.436	0
Hypertension	97 (50.8)	80 (51.9)	17 (45.9)	0.82 (0.43-1.56)	.538	0
Lung disease	33 (17.3)	26 (16.8)	7 (18.9)	1.19 (0.52-2.72)	.669	0
COPD	21 (11.0)	17 (11.0)	4 (10.8)	1.02 (0.36-2.87)	.970	0
Current smoking	23 (12.0)	20 (12.9)	3 (8.1)	0.62 (0.19-2.01)	.425	0
Diabetes	47 (24.6)	39 (25.3)	8 (21.6)	0.82 (0.37-1.80)	.626	0
Chronic kidney disease	41 (22.0)	35 (22.8)	6 (18.2)	0.78 (0.32-1.89)	.588	5 (1;4)

Immunodepression	22 (11.5)	14 (9.09)	8 (21.6)	2.28 (1.04-4.99)	.039*	0
Cancer	35 (18.3)	24 (15.6)	11 (29.7)	2.11 (1.04-4.28)	.037*	0
Preexisting neuropsychiatric comorbidities	136 (71.2)	109 (70.1)	27 (73.0)	1.16 (0.56-2.40)	.687	0
Cognitive Impairment	75 (39.3)	60 (38.9)	15 (40.5)	1.07 (0.55-2.06)	.843	0
Parkinsonism	12 (6.3)	7 (4.55)	5 (13.5)	2.66 (1.04-6.85)	.042*	0
Cerebrovascular disease	42 (22.0)	36 (23.4)	6 (16.2)	0.70 (0.30-1.69)	.431	0
Brain tumor	12 (6.3)	7 (4.58)	5 (14.0)	2.83 (1.09-7.28)	.031*	2 (1;1)
Epilepsy	6 (3.1)	6 (3.9)	0	NA		0
Amyotrophic lateral sclerosis	2 (1.1)	0	2 (5.4)	NA		0
Peripheral neuropathy	4 (2.1)	4 (2.6)	0	NA		0
Other neurological disorders	5 (2.6)	5 (3.3)	0	NA		0
Depression-Anxiety	56 (29.3)	46 (29.9)	10 (27.0)	0.93 (0.45-1.92)	.854	0
Bipolar disorders	5 (2.6)	5 (3.3)	0	NA		0
Psychosis	4 (2.1)	4 (2.6)	0	NA		0
Symptoms						
Fever	133 (69.6)	111 (72.1)	22 (59.5)	0.60 (0.31-1.14)	.120	0
Cough	112 (58.6)	95 (61.7)	17 (45.9)	0.56 (0.29-1.07)	.080*	0
Sputum	27 (14.2)	19 (12.4)	8 (21.6)	1.73 (0.79-3.80)	.168	1 (1;0)
Rhinorrhea	19 (10.0)	16 (10.4)	3 (8.33)	0.76 (0.23-2.47)	.600	1 (1;0)
Odynophagia	6 (3.16)	6 (3.92)	0	NA		1 (1;0)
Chest pain	9 (4.74)	9 (5.88)	0	NA		1 (1;0)
Dyspnea	108 (56.5)	77 (50.0)	31 (83.8)	4.43 (1.85-10.6)	.001*	0
Abdominal pain	15 (7.9)	8 (5.23)	7 (18.9)	3.23 (1.41-7.36)	.005*	1 (1;0)
Nausea or vomiting	16 (8.4)	14 (9.15)	2 (5.4)	0.61 (0.15-2.55)	.503	1 (1;0)
Diarrhea	30 (15.8)	27 (17.6)	3 (8.1)	0.43 (0.13-1.40)	.162	1 (1;0)
Anorexia	49 (25.8)	40 (26.1)	9 (24.3)	0.91 (0.43-1.92)	.799	1 (1;0)
Fatigue	109 (57.1)	84 (54.5)	25 (67.6)	1.67 (0.84-3.31)	.148	0
Arthralgia	2 (1.06)	1 (0.65)	1 (2.78)	3.02 (0.41-22.05)	.277	2 (1;1)
Skin lesions	24 (12.6)	19 (12.4)	5 (13.5)	1.09 (0.42-2.81)	.850	1 (1;0)
Geriatric symptoms ^b						
Fall	33 (17.6)	24 (15.7)	9 (25.7)	1.72 (0.81-3.67)	.160	3 (1;2)
Delirium	93 (48.7)	71 (46.1)	22 (59.5)	1.64 (0.85-3.17)	.140	0
Neurological symptoms						
Anosmia	12 (6.3)	10 (6.5)	2 (5.4)	0.82 (0.20-3.40)	.789	0
Ageusia	8 (4.2)	7 (4.5)	1 (2.7)	0.60 (0.08-4.40)	.618	0
Myalgia	19 (9.9)	13 (8.4)	6 (16.2)	1.76 (0.74-4.22)	.204	0
Headache	12 (6.3)	10 (6.5)	2 (5.54)	0.80 (0.19-3.32)	.758	0
Dizziness	4 (2.1)	4 (2.6)	0	NA		
Sensory symptoms	11 (5.9)	9 (6.0)	2 (5.4)	0.96 (0.23-3.99)	.956	5 (5;0)
Motor deficit	22 (11.9)	19 (12.7)	3 (8.6)	0.69 (0.21-2.25)	.538	6 (4;2)
Movement disorder	2 (1.1)	2 (1.3)	0	NA	NA	6 (5;1)
Behavioral disturbance	33 (17.7)	27 (18.0)	6 (16.7)	0.91 (0.38-2.20)	.840	5 (4;1)
Cognitive disturbance	43 (22.5)	37 (24.0)	6 (16.2)	0.62 (0.26-1.50)	.300	0
Gait impairment	20 (10.7)	15 (10)	5 (13.9)	1.43 (0.45-3.68)	.456	5 (4;1)
Swallowing impairment	15 (7.9)	12 (7.8)	3 (8.1)	1.04 (0.32-3.40)	.941	0
Impaired consciousness	34 (17.8)	23 (14.9)	11 (29.7)	2.10 (1.04-4.26)	.038*	0
Psychiatric symptoms						

Depression-Anxiety	35 (18.7)	32 (21.2)	3 (8.3)	0.38 (1.12-1.23)	.108	4 (3;1)
Psychotic signs	11 (5.9)	8 (5.3)	3 (8.3)	1.53 (0.47-5.00)	.480	4 (3;1)
Post-traumatic stress	3 (1.6)	3 (2.0)	0	NA		4 (3;1)
Sleep disturbance	16 (8.4)	13 (8.5)	3 (8.1)	0.96 (0.29-3.13)	.950	1 (1;0)
Catatonia	2 (1.1)	2 (1.3)	0	NA	NA	0
Neurological disorders						
Encephalopathy	116 (60.7)	89 (57.8)	27 (72.9)	1.85 (0.89-3.82)	.098*	0
Cerebrovascular disease	12 (6.3)	9 (5.8)	3 (8.3)	1.38 (0.42-4.50)	.600	1 (0;1)
Encephalitis	6 (3.2)	5 (3.3)	1 (2.8)	0.80 (0.11-5.82)	.824	1 (0;1)
Seizures	7 (3.7)	4 (2.6)	3 (8.3)	2.54 (0.77-8.30)	.123	1 (0;1)
Guillain Barré syndrome	1 (0.5)	1 (0.6)	0	NA	NA	0
Myelitis	0	NA	NA	NA	NA	0
Treatments						
Hydroxychloroquine	23 (12.0)	20 (12.9)	3 (8.1)	0.63 (0.19-2.02)	.432	0
Antiviral treatments	17 (8.9)	15 (9.7)	2 (5.4)	0.57 (0.14-2.38)	.444	0
Corticosteroids	42 (22.1)	26 (17.0)	16 (44.4)	4.04 (1.57-5.88)	.001*	1 (0;1)
Immunomodulatory/ Anti-cytokine agents	14 (7.3)	12 (7.8)	2 (5.4)	0.66 (0.16-2.75)	.566	0
Antibiotics	141 (73.8)	111 (72.1)	30 (81.1)	1.56 (0.68-3.54)	.300	0
Oxygen-therapy	139 (72.8)	104 (67.5)	35 (94.6)	7.40 (1.78-30.7)	.006*	0
Median flow L/min (max 15)	4 [2-12]	4 [2-10]	12 [4-15]	1.10 (1.03-1.18)	.004*	20 (14;6)
Flow at 15L/min	27 (22.5)	14 (15.4)	13 (44.8)	3.14 (1.50-6.54)	.002*	19 (13;6)
Treatment for AHRF	51 (26.7)	34 (22.1)	17 (45.9)	2.50 (1.31-4.78)	.005*	0
Decision to NR or Palliative Care	57 (29.8)	28 (18.2)	29 (78.4)	12.0 (5.44-26.3)	<.001*	0
Admission in Intensive care Unit	28 (14.7)	23 (15.0)	5 (13.5)	0.87 (0.34-2.24)	.780	0
Critical illness neuromyopathy	13/28	13/28	NA	NA	NA	
Length of hospital stay	13 [9-24]	16 [10-29]	8 [5-12]	0.88 (0.83-0.94)	<.001*	1 (1;0)

Notes: Data are presented as median and interquartile range [IQR] for continuous variables or as number and (percentage) for categorical variables.

Missing values are presented as total number and (number in the survivor group; number in the non-survivor group).

CI=confidence interval; MMSE= Mini Mental State Examination; BMI=body mass index; COPD= chronic obstructive pulmonary disease; NA= Not Applicable; NR= not to resuscitate; AHRF= acute hypoxemic respiratory failure; Ref. = reference category for the calculation of HRs in categorical variables with more than 2 categories.

^aalready hospitalized for other reason when affected by COVID-19.

^bsee explanation in [Supplementary data Method 2](#).

* $p < .1$

Table 2: Univariate Analysis for Instantaneous risk of Death at 40 days according to Paraclinical Findings in 191 Older inpatients with Covid-19 and Neuropsychiatric conditions

Variables	Vital status at 40 days			Hazard ratio (95%, CI)	p Values	Missing values
	Total N=191 (100)	Survivors n=154 (80.6)	Non-survivors n=37 (19.4)			
Laboratory findings						
Hemoglobin, g/dL	11.8 [10.4-13.3]	11.8 [10.5-13.3]	12.0 [9.9-14.0]	1.02 (0.86-1.20)	.816	2 (0;2)
Anemia	116 (61.4)	95 (61.7)	21 (60.0)	0.90 (0.45-1.76)	.742	
White blood cell count, X 10 ⁹ /L	7.3 [5.3-10.4]	7.0 [4.9-10.1]	9.1 [6.5-12.5]	1.08 (1.03-1.13)	.001*	3 (0;3)
White blood cell count groups					.087*	
<4	26 (13.8)	24 (15.6)	2 (5.9)	0.45 (0.10-1.93)	.284	
4-10	108 (57.5)	90 (58.4)	18 (52.9)	Ref		
>10	54 (28.7)	40 (26.0)	14 (41.2)	1.73 (0.86-3.49)	.122	
Neutrophil count X 10 ⁹ /L	5.7 [3.6-8.0]	5.4 [3.3-7.6]	7.8 [5.2-9.4]	1.11 (1.04-1.19)	.002*	4 (0;4)
Neutrophil groups					.028*	
<1.7	15 (8.1)	13 (8.5)	2 (6.1)	1.14 (0.26-5.13)	.856	
1.7-7.0	102 (55.1)	90 (59.2)	12 (36.4)	Ref.		
>7.0	68 (36.8)	49 (32.2)	19 (57.6)	2.60 (1.26-5.35)	.010*	
Lymphocyte count X 10 ⁹ /L	0.77 [0.55-1.07]	0.82 [0.61-1.09]	0.57 [0.4-0.8]	0.19 (0.06-0.55)	.002*	4 (1;3)
Lymphopenia <1.5	172 (92.0)	139 (90.9)	33 (97.1)	3.15 (0.43-23.0)	.258	
Cut-off < 0.62	59 (31.5)	39 (25.5)	20 (58.8)	3.44 (1.73-6.80)	<.001*	
Neutrophil/Lymphocyte ratio	6.1 [3.6-11.2]	5.9 [3.5-9.6]	11.3 [5.8-18.6]	1.05 (1.03-1.07)	<.001*	5 (1;4)
Cut-off ≥ 9.9	59 (31.7)	37 (24.2)	22 (66.7)	4.98 (2.41-10.30)	<.001*	
Platelet count, X 10 ⁹ /L	223 [163-291]	233 [170-293]	192 [121-258]	0.99 (0.99-1.00)	.006*	4 (1;3)
Thrombocytopenia <150	33 (17.6)	17 (11.1)	16 (47.1)	5.35 (2.72-10.52)	<.001*	
Albumin, g/L	29 [26-32.6]	29 [26-33]	29 [27-33]	1.02 (0.95-1.10)	.524	12 (3;9)
Malnutrition <35	151 (84.4)	128 (84.8)	23 (82.1)	0.83 (0.32-2.18)	.710	
Calcium adjusted, mmol/L ^a	2.46 [2.36-2.57]	2.48 [2.37-2.58]	2.38 [2.24-2.50]	0.19 (0.03-1.02)	.052*	15 (8;7)
Glycemia, mmol/L	5.9 [5.2-7.3]	5.8 [5.2-7.2]	6.8 [5.6-8.1]	1.20 (1.05-1.36)	.005*	23 (15;8)
Sodium, mmol/L	139 [136-141]	138 [136-141]	140 [137-144]	1.05 (1.00-1.10)	.018*	3 (0;3)

Potassium, mmol/L	4 [3.7-4.3]	4 [3.6-4.3]	4 [3.8-4.4]	1.27 (0.65-2.51)	.484	3 (0;3)
Uremia, mmol/L	8.3 [5.7-11.3]	8 [5.4-10.5]	10 [8-17]	1.06 (1.03-1.09)	<.001*	3 (0;3)
Osmolarity of plasma, mOsm ^b	298 [292-307]	298 [292-306]	304 [300-324]	1.03 (1.01-1.04)	<.001*	7 (2;5)
Creatinine, µmol/L	85 [67-108]	82 [67-106]	96 [74-132]	1.00 (1.00-1.00)	.018*	3 (0;3)
Glomerular filtration rate ^c	70.6 [47.8-83.5]	70.9 [51.4-84.2]	59.5 [39.5-81.4]	0.99 (0.97-1.00)	.072*	3 (0;3)
C-reactive protein	95 [51-170]	95 [42-158]	141 [68-177]	1.00 (0.99-1.00)	.142	4 (1;3)
Procalcitonin, µg/l	0.21 [0.1-0.56]	0.19 [0.09-0.45]	0.38 [0.16-0.92]	0.98 (0.85-1.13)	.795	41(33;8)
Serum ferritin, µg/l	661 [382-1228]	634 [379-1139]	849 [468-1665]	1.00 (1.00-1.00)	.013*	31 (20;11)
Interleukine-6	38.8 [16.4-85.4]	38.8 [14.4-85.5]	42.1 [31-135]	0.99 (0.99-1.00)	.967	143 (111;32)
Activated fibrinogen, g/L	5.7 [4.8-7.0]	5.8 [4.8-7.0]	5.6 [4.2-6.9]	0.84 (0.66-1.07)	.168	28 (20;8)
Prothrombin time, %	87 [75-97]	88 [77-98]	82 [65-95]	0.98 (0.97-0.99)	.037*	18 (12;6)
Lactate dehydrogenase, U/L	371 [281-477]	362 [277-457]	414 [328-531]	1.00 (0.99-1.00)	.093*	31 (20;11)
Creatine kinase, U/L	94 [48-329]	87 [47-287]	161 [91-571]	1.00 (0.99-1.00)	.412	52 (38;14)
Aspartate aminotransferase, U/L	39 [27-59]	37 [27-56]	44 [30-1066]	1.005 (1.00-1.01)	<.001*	8 (2;6)
Alanine aminotransferase, U/L	28 [18-46]	28 [19-46]	31 [18-47]	1.004 (0.99-1.01)	.202	8 (2;6)
NT Pro-BNP, ng/L	1028 [302-3735]	786 [268-2768]	3426 [1099-7237]	1.00 (0.99-1.00)	.346	74 (59;15)
Hs cardiac troponin T, ng/L	26.5 [16-53]	25.7 [16-45]	42 [22-68]	1.00 (0.99-1.00)	.317	56 (42;14)
D-Dimer, ng/ml	1620 [911-3545]	1560 [820-3289]	2680 [1299-8150]	1.00 (0.99-1.000)	.834	95 (73;22)
Arterial blood gas						80 (68;12)
PaO ₂ , mmHg	74 [65-84]	75 [68-84]	66 [50-84]	0.97 (0.95-1.00)	.058*	
PaCO ₂ , mmHg	35 [32.0-40.3]	36 [32-4]	34 [30-41]	0.99 (0.95-1.04)	.870	
pH	7.46 [7.4-7.5]	7.46 [7.43-7.50]	7.45 [7.41-7.49]	0.03 (0.00-4.71)	.169	
Chest CT lesion	123 (76.4)	102 (76.7)	21 (75.0)	0.92 (0.39-2.15)	.841	30 (21;9)
Lung involvement					.520	
0-10%	58 (37.4)	49 (38.3)	9 (33.3)	Ref.		36 (26;10)
10-25%	44 (28.4)	34 (26.6)	10 (37.0)	1.56 (0.63-3.84)	.357	
>25%	53 (34.2)	45 (35.1)	8 (29.6)	0.95 (0.36-2.45)	.881	
Lesion feature						
Consolidation	96 (61.1)	79 (60.7)	17 (62.9)	1.07 (0.49-2.34)	.862	34 (24;10)
Ground-glass opacity	116 (73.4)	99 (75.6)	17 (62.9)	0.57 (0.26-1.24)	.161	33 (23;10)
Crazy paving	56 (38.9)	45 (37.2)	11 (47.8)	1.37 (0.62-3.07)	.434	47 (34;13)

Embolic lesion	15 (9.3)	12 (9.0)	3 (10.3)	1.04 (0.32-3.45)	.942	29 (21;8)
----------------	----------	----------	----------	------------------	------	-----------

Notes: Data are presented as median and interquartile range [IQR] for continuous variables or as number and (percentage) for categorical variables. Missing values are presented as total number and (number in the survivor group; number in the non-survivor group).

CI: confidence interval; NT Pro-BNP: N-terminal pro b-type natriuretic peptide; Hs: hypersensitive; PaO₂: partial pressure of oxygen; PaCO₂: partial pressure of carbon dioxide; CT: computerized tomography; Ref. = reference category for the calculation of hazard ratios in categorical variables with more than 2 categories.

^aThe equation used for calculating serum calcium adjusted = Calcium + 0.025 (40- Albumin).

^bThe equation used for calculating serum osmolality (mosm/L) = [(Na + K) x 2] + [urea (mmol/L)] + [glucose (mmol/L)]

^cThe CDK-EPI equation was used for calculating the glomerular filtration rate.

**p* <.1

Table 3: Multivariate Analysis for Instantaneous risk of Death at 40 days after forward stepwise selection in 191 Older inpatients with Covid-19 and Neuropsychiatric conditions

Variables included in forward stepwise	<i>p</i> Values from forward stepwise	Final multivariate model	
		Hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> Values
Male gender	.0467		
South Asian ethnicity	.0051		
Activity Daily Living score	.0006	0.69 (0.58-0.82)	<.0001
Frailty Rockwood score	ns		
Immunodepression	ns		
Cancer	ns		
Brain tumor	.0121		
Parkinsonism	ns		
Dyspnea	.0030		
Cough	ns		
Abdominal pain	.0149		
Impaired consciousness	.0025		
Encephalopathy	ns		
Corticosteroids	ns		
Oxygen therapy	ns		
Treatment for AHRF	ns		
White blood cell count, X 10 ⁹ /L	ns		
Neutrophil count X 10 ⁹ /L	ns		
Neutrophil to lymphocyte count ratio ≥ 9.9	<.0001	5.78 (2.72 -12.2)	<.0001
Thrombocytopenia <150 X 10 ⁹ /L	.0002	5.68 (2.73-11.8)	<.0001
Sodium, mmol/L	ns		
Uremia, mmol/L	ns		
Osmolarity, mOsm	ns		
Creatinine, μmol/L	ns		

Notes: CI: confidence interval; AHRF: acute hypoxemic respiratory failure,

ns: non-significant with $p > .05$

Figure 1: Patient inclusion flowchart

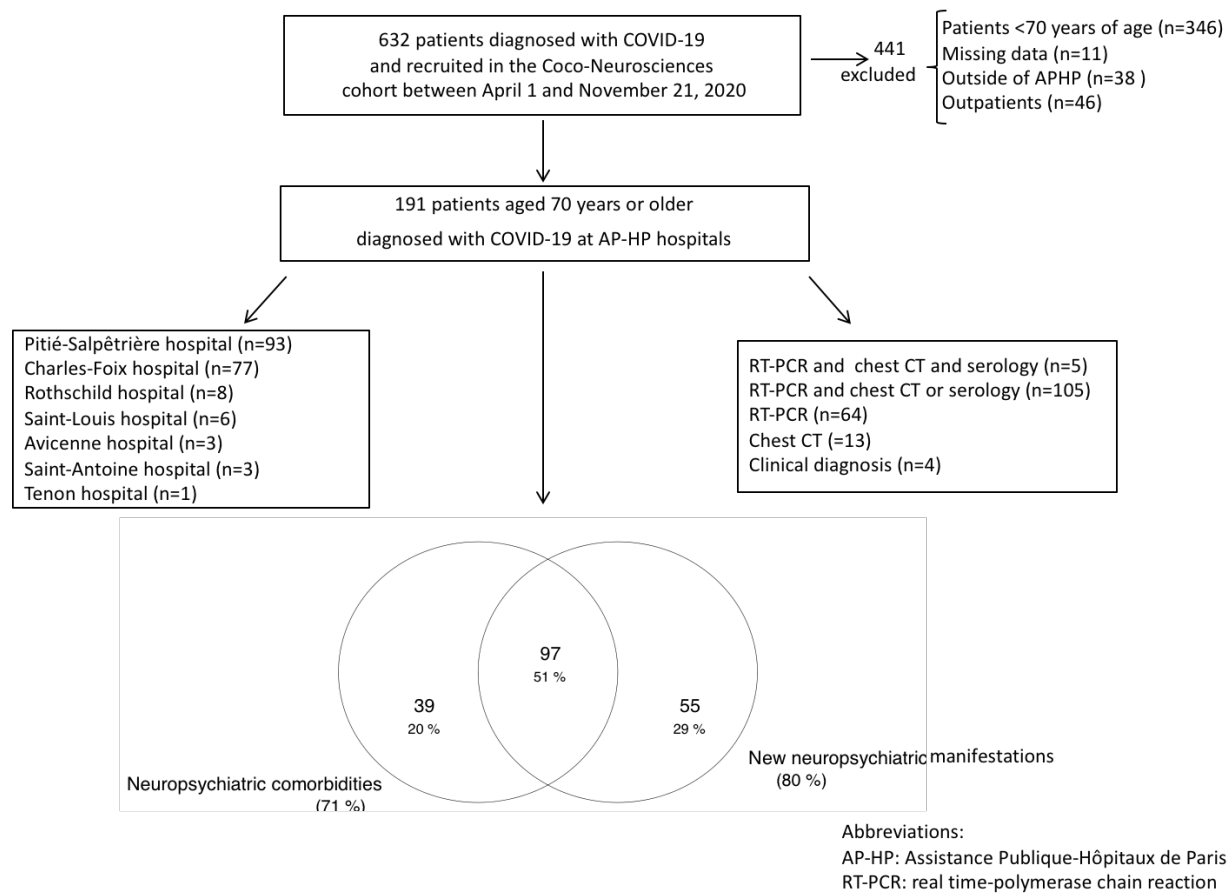
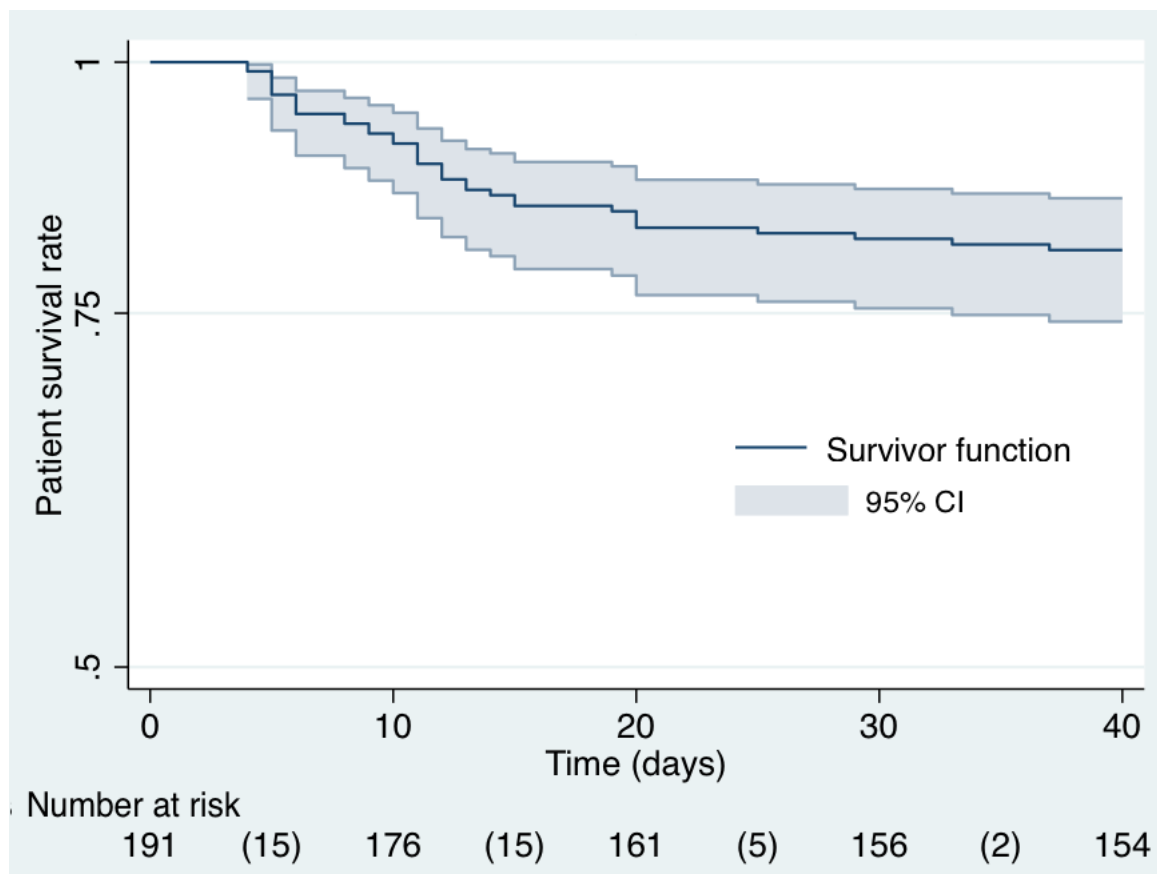


Figure 2: The Kaplan-Meier survival estimate for the 191 Older patients with COVID-19 and Neuropsychiatric conditions



Notes: Number of deaths in parentheses; CI: confidence interval.

Supplementary material

eMethods 1: STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of cohort studies

eMethods 2: Definition and criteria of studied clinical and paraclinical variables

eResult: explanation of the exclusion and choice of variables for forward stepwise

eMethods 1: STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of cohort studies

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract → Page 1,3,4 (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found → Page 3,4
Introduction		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported → Page 5
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses → Page 6
Methods		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper → Page 6,7
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection → Page 6,7
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up → Page 7 (b) For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable → Page 8,9, e-Method 2
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group → Page 7, 8,9, e-Method 2
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias → Page 7, 9, e-Method 2
Study size	10	Explain how the study size was arrived at → Page 7, Figure 1
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why → Page 8, 9
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding → Page 9 (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions → Page 9 (c) Explain how missing data were addressed → Page 9, Table1-2 (d) If applicable, explain how loss to follow-up was addressed (e) Describe any sensitivity analyses

Results		
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed → Page 10, Figure 1 (b) Give reasons for non-participation at each stage → Figure 1 (c) Consider use of a flow diagram → Figure 1
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders → Page 10,11, Table 1,2 (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest → Table 1,2 (c) Summarise follow-up time (eg, average and total amount) → Page 11
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures over time → Page 11
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included → Page 11,12,13 Table 1,2 (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized → Page 12, Table 1,2, (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
Discussion		
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives → Page 13
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias → Page 21
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence → Page 13-20
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results → Page 20
Other information		
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based → Page 24

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at <http://www.strobe-statement.org>.

eMethods 2: Definition and criteria of studied clinical and paraclinical variables

Supplementary data Method 2

Supplementary data Method 2

Assessment criteria and definition

Autonomy was assessed using the Activities of Daily Living scale 6 basic self-care tasks scored from 0 (totally dependent) to 6 (total autonomy) (1).

Frailty was assessed with the adjusted Rockwood score from 0 (no frailty) to 7 (maximal frailty) (2).

Delirium was assessed using the Confusion Assessment Method (3). Delirium was included in the neurological manifestations for prevalence calculations, but we also considered it as a geriatric manifestation of COVID-19 as in some previous studies (4-6).

Falls occurring as an initial manifestation of COVID-19 or during infection were included but not previous history of falls with no worsening. Fall was classified as a geriatric manifestation of COVID-19 as it was in some previous studies (4,6).

Patients considered to be immunocompromised had solid or hematological malignancy with current chemotherapy, were organ transplant recipients or were known to have an HIV infection or were treated with long-term corticosteroids.

Cancers and brain tumors were considered comorbidities if disease was progressive. Cancers considered to be in remission were not taken into account.

Parkinsonism included Parkinson's disease and related syndromes.

Treatment for acute hypoxemic respiratory failure included high-level supplemental oxygen (at a flow rate of 15 L per min or greater) or mechanical ventilation (invasive or noninvasive) (7).

Antiviral, immunomodulatory or anticytokine agents were generally administered through enrollment in clinical trials or were used in patients with severe hyperinflammatory markers at the discretion of treating clinicians in collaboration with infectious disease consultants (compassionate use.)

Decisions to not resuscitate or not admit to intensive care unit (ICU) and/or to initiate palliative care were made by multidisciplinary teams, taking into consideration patients' and relatives' wishes, preexisting autonomy and frailty, baseline medical status and chronic life-limiting illnesses.

Neurological and psychiatric manifestations included new symptoms or worsening of known symptoms that occurred at the onset or the course of COVID-19 infection. Previous neurological deficits or symptoms that did not differ from baseline were not considered. Symptoms of impaired consciousness were reported when they were considered to be unrelated to sedative and hypnotic agents used in ICU.

Psychiatric symptoms included anxiety, mood and sleep disturbances, psychotic signs, symptoms of post-traumatic stress, and symptoms of catatonia.

New-onset neurological disorders included encephalopathy, cerebrovascular disease, epileptic seizures, encephalitis, myelitis and Guillain-Barré syndrome. Acute encephalopathy was defined as a pathological brain process that develops rapidly (less than 4 weeks, but usually within hours to a few days) and can manifest as neurological symptoms such as changed personality, behavior, and cognition changes, or decreased level of consciousness (including clinical presentations of delirium or coma) (8). Encephalopathy was considered toxic-metabolic in nature if abnormalities were noted on electrolytes, glycemia, uremia, renal/hepatic functions, or blood gases and without evidence of other causes. Typical patterns of toxic-metabolic encephalopathy on EEG, when available, were useful for the diagnosis.

Cerebrovascular diseases, including new ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, or cerebral venous sinus thrombosis were diagnosed by specialized vascular neurologists. Traumatic intracranial hemorrhages were excluded.

Epileptic seizures included new seizures or exacerbation of seizures in patients with known epilepsy. Both generalized and focal convulsive seizures were included. Non convulsive seizures required confirmation of epileptiform abnormalities on EEG.

Diagnoses of encephalitis, myelitis, and Guillain Barré were based on criteria of the Liverpool Brain infections Group (9).

Critical illness polyneuropathy or myopathy unrelated to COVID-19 was diagnosed in the recovery phase after sedative drug withdrawal in post ICU wards by intensive care physicians and neurologists.

Routine blood tests included complete blood cell count, glycemia, urea, electrolytes, C-reactive protein (CRP), renal and hepatic function tests. Values of serum sodium, potassium, urea, and glycemia were used to calculate plasma osmolality. Values of serum calcium and albumin were used to calculate calcium adjusted.

Extended blood tests included additional inflammatory biomarkers (serum ferritin, fibrinogen, procalcitonin, interleukine-6), coagulation profile (prothrombin time in percentage), creatine kinase, lactate dehydrogenase, markers of thrombosis (D-Dimer) and of acute cardiac decompensation (NT Pro-BNP), high- sensitivity troponin T.

Patients admitted at an early stage of COVID-19-infection may have normal routine biological findings at admission, which can worsen as the disease progresses. To obtain the maximal inflammatory profile, we chose the highest CRP value and the corresponding white blood cell count, and to depict the maximal effect of viral infection on immune blood cells (10), we reported the nadir value of lymphocyte count. We then calculated the neutrophil to lymphocyte ratio (N/L ratio) (11-14) using the nadir value of lymphocyte and the corresponding neutrophil count on the same complete blood count in order to reflect the combination of inflammatory response and immunity imbalance. Others biological results were collected during the same period, as closely as possible to peak CRP.

Most of the older patients with COVID-19 exhibited lymphopenia as compared to a reference value of $1.5 \times 10^9/L$ (15,16) and this threshold was not associated with mortality (15) but a lower threshold <0.8 was (17). We therefore built receiver operating characteristic curves for the lymphocyte count and N/L ratio and, and if the area under curve was > 0.6 , we defined the optimal threshold to predict death by maximizing the Youden index.

Chest CT findings included the presence or absence of typical COVID-19 abnormalities, percentage of lung involvement (0-10%, 10-25%, $>25\%$) and features (condensation, ground-glass, crazy-paving, embolic complications) according to the radiology report.

References:

1. Katz S, Akpom CA. 12. Index of ADL. *Med Care*. 1976;14(Suppl. 5):116–118. doi:10.1097/00005650-197605001-00018
2. Rockwood K, Song X, MacKnight C, et al. A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *CMAJ*. 2005;173:489–495. doi:10.1503/cmaj.050051
3. Inouye SK, Westendorp RGJ, Saczynski JS. Delirium in Elderly people. *Lancet*. 2014;383:911–922. doi:10.1016/S0140-6736(13)60688-1
4. Karlsson LK, Jakobsen LH, Hollensberg L, et al. Clinical presentation and mortality in hospitalized patients aged 80+ years with COVID-19-A retrospective cohort study. *Arch Gerontol Geriatr*. 2021;94:104335. doi:10.1016/j.archger.2020.104335.

5. Graham NSN, Junghans C, Downes R, et al. SARS-CoV-2 infection, clinical features and outcome of COVID-19-19 in United Kingdom nursing homes. *J Infect.* 2020;81:411-419. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.073.
6. Annweiler C, Sacco G, Salles N, et al. National French Survey of Coronavirus Disease (COVID-19) Symptoms in People Aged 70 and Over. *Clin Infect Dis.* 2021;72:490-494. doi: 10.1093/cid/ciaa792.
7. Cummings MJ, Baldwin MR, Abrams D, et al. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet.* 2020;395:1763-1770. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31189-2.
8. Slooter AJC, Otte WM, Devlin JW, et al. Updated nomenclature of delirium and acute encephalopathy: statement of ten Societies. *Intensive Care Med.* 2020;46:1020-1022. doi: 10.1007/s00134-019-05907-4.
9. Ellul MA, Benjamin L, Singh B, et al. Neurological associations of COVID-19-19. *Lancet Neurol.* 2020;19:767-783. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30221-0.
10. Wang L, He W, Yu X, et al. Coronavirus disease 2019 in elderly patients: Characteristics and prognostic factors based on 4-week follow-up. *J Infect.* 2020;80:639-645. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.019.
11. Yan X, Li F, Wang X, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio as prognostic and predictive factor in patients with coronavirus disease 2019: A retrospective cross-sectional study. *J Med Virol.* 2020;92:2573-2581. doi: 10.1002/jmv.26061.
12. Liu Y, Du X, Chen J, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J Infect.* 2020;81:e6-e12. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.002.
13. Liu L, Zheng Y, Cai L, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, a critical predictor for assessment of disease severity in patients with COVID-19. *Int J Lab Hematol.* 2021 Apr;43(2):329-335. doi: 10.1111/ijlh.13374.
14. Wang S, Fu L, Huang K, Han J, Zhang R, Fu Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio on admission is an independent risk factor for the severity and mortality in patients with coronavirus disease 2019. *J Infect.* 2021;82:e16-e18. doi: 10.1016/j.jinf.2020.09.022.
15. Vrillon A, Hourregue C, Azuar J, et al. COVID-19-19 in Older Adults: A Series of 76 Patients Aged 85 Years and Older with COVID-19-19. *J Am Geriatr Soc.* 2020;68:2735-2743. doi: 10.1111/jgs.16894.

16. Zerah L, Baudouin É, Pépin M, et al. Clinical Characteristics and Outcomes of 821 Older Patients With SARS-Cov-2 Infection Admitted to Acute Care Geriatric Wards. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2021;76:e4-e12. doi: 10.1093/gerona/glaa210.
17. Steinmeyer Z, Vienne-Noyes S, Bernard M, et al. Acute Care of Older Patients with COVID-19: Clinical Characteristics and Outcomes. *Geriatrics (Basel)*. 2020;5:65. doi: 10.3390/geriatrics5040065.

eResult: explanation of the exclusion and choice of variables for forward stepwise

Supplementary data Result

Multivariate analysis

To perform a forward stepwise selection, we excluded variables with $\geq 15\%$ of missing data in the non-survivor group. We excluded “decision to not resuscitate or to initiate palliative care” and “length of hospital stay” because the former is a collective decision already based on poor clinical prognosis and loss of autonomy, and the latter reflects a rapid progression of the disease in non survivors and is not, for this reason, a real clinical predictive factor.

We excluded lymphocyte count and lymphocyte cut-off because the lymphocyte count value was used to calculate the N/L ratio. Among two paraclinical variables of the same category (WBC count and WBC groups, neutrophil count and neutrophil groups, platelet and thrombocytopenia, serum creatinine and glomerular filtration rate) the one with smaller *P* value on univariate analysis were chosen. The N/L ratio cut-off was included rather than continuous N/L ratio value (both with $p < 0.001$ on univariate analysis) because the clinical application of a cut-off is more direct.

Annexe 4

Article 9 : Epilepsy related to focal neuronal lipofuscinosis: extra-frontal localization, EEG signatures and GABA involvement.

Authors:

Valerio Frazzini^{1,2,3}, MD, PhD, Bertrand Mathon^{2,3,5}, MD, Florian Donneger^{3,8,9}, PhD, Louis Cousyn^{1,2,3}, MD, **Aurélie Hanin², PharmD**, Vi Huong Nguyen-Michel¹, MD, Claude Adam¹, MD, PhD, Virginie Lambrecq^{1,2,3}, MD, PhD, Sophie Dupont^{1,3,6} MD, PhD, Jean Christophe Poncer^{3,8,9} PhD, Franck Bielle^{2,3,7*} MD, PhD, and Vincent Navarro, MD, PhD,^{1,2,3*†}

¹AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, Epilepsy Unit, Reference Center for Rare Epilepsies, and Department of Clinical Neurophysiology F-75013, Paris, France

² Paris Brain Institute, ICM, INSERM, CNRS, F-75013, Paris, France

³Sorbonne Université, F-75013, Paris France

⁵AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, Department of Neurosurgery, F-75013, Paris, France

⁶AP-HP, Rehabilitation Unit, Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013, Paris, France

⁷AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, Department of Neuropathology, F-75013, Paris, France

⁸ Inserm UMR-S 1270, F-75005, Paris, France

⁹ Institut du Fer à Moulin, F-75005, Paris, France

* Equally contributed

Corresponding authors:

Dr Franck Bielle and

Pr Vincent Navarro

Corresponding author's address: Epilepsy Unit, Pitié-Salpêtrière Hospital, 47 boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France

Corresponding author's phone and fax: Tel: 33 1 42 16 19 40, Fax: 33 1 42 16 19 42

Corresponding author's e-mail address: vincent.navarro@aphp.fr

ORCID: Valerio Frazzini 0000-0003-1187-3352, Franck Bielle 0000-0001-6564-6388

Vincent Navarro 0000-0003-0077-8114

Character count for title: 102

Abstract word count: 253

Text word count: 1995

References: 20

Keywords: Lipofuscinosis, Focal seizures, sEEG, Dysmorphic appearing neurons, Focal cortical Dysplasia, MEA, GABA.

Abbreviations: DANs = dysmorphic-appearing neurons, FCDIIb = focal cortical dysplasia of type IIb, FLE = frontal lobe epilepsy, FNL = focal neuronal lipofuscinosis, STG = superior temporal gyrus, MEA= MultiElectrode Array

Financial Disclosures:

Valerio Frazzini reports no disclosure

Bertrand Mathon reports no disclosure

Florian Donneger reports no disclosures

Louis Cousyn reports no disclosures

Aurélie Hanin reports no disclosures

Vi-Huong Nguyen-Michel reports no disclosure

Claude Adam reports no disclosure

Virginie Lambrecq reports no disclosure

Sophie Dupont reports fees from Boards with UCB Pharma, Eisai, Liva Nova, GW Pharma, Takeda, Novartis.

Jean Christophe Poncer reports no disclosure

Franck Bielle reports funding of research out of the scope of this article by Abbvie, a next-of-kin employed by Bristol-Myers Squibb, fees of travel and conference out of the scope of this article by Bristol-Myers Squibb

Vincent Navarro reports fees from Boards with UCB Pharma, Eisai, Liva Nova, GW Pharma.

Study Funded: This work received support from the “Investissements d’avenir” program ANR-10-IAIHU-06, and from the Fondation Assistance Publique Hôpitaux de Paris (EPIRES – Marie Laure PLV Merchandising).

Abstract

Focal neuronal lipofuscinosis (FNL) is an uncommon epileptic disorder related to an excess of lipofuscin accumulation within dysmorphic-appearing neurons (DANs), whose epileptogenic mechanisms are still poorly understood. It shares some clinical and neuroimaging similarities with focal cortical dysplasia of type IIb (FCDIIb), but it represents a different pathological entity. Here, we identified two patients with FNL among a 10-year cohort of 323 patients who underwent neurosurgery for a focal pharmaco-resistant epilepsy. We describe the electroclinical, metabolic and neuropathological features of both patients with FNL who benefited from a comprehensive presurgical investigation. While the previous reports showed frontal lobe localization of the lesion, FNL was identified in the temporal lobe, in one of our patients. EEG investigations in both patients showed striking focal and rich interictal activity resembling that described in FCDIIb. Besides focal intraneuronal lipofuscin accumulation, the neuropathological analysis demonstrated that somata of DANs were surrounded by a large amount of GABAergic presynaptic buttons, suggesting the involvement of interneurons in the epileptogenicity of FNL. To further explore the role of GABAergic transmission in the generation of epileptiform activity in FNL, we performed *in vitro* multi-electrode array recordings on the post-surgery tissue from one patient. Spontaneous interictal-like discharges (IILDs) were identified only in the restricted area displaying the highest density of lipofuscin-containing DANs, suggesting a close correlation between the density of lipofuscin-containing neurons and epileptogenicity. Moreover, IILDs were blocked by the GABA_A receptor antagonist gabazine. All together, these findings showed how GABA signaling may contribute to the generation of interictal-like activity in FNL tissue.

Introduction

Focal neuronal lipofuscinosis (FNL) corresponds to an excess of lipofuscin accumulation within dysmorphic-appearing neurons (DANs) and was described as the pathological hallmark of a distinct type of pharmaco-resistant frontal lobe epilepsy (FLE) [1,2]. While FNL shares some clinical and neuroimaging features with focal cortical dysplasia of type IIb (FCDIIb), it represents a different neuropathological entity currently described in seven patients [1,3]. To date, it is still unclear if FNL displays peculiar ictal or interictal electrophysiological features and little is known about the basis of its epileptogenicity. Here, we describe the electroclinical, metabolic and neuropathological features of two patients with focal pharmaco-resistant epilepsy due to FNL who benefited from a comprehensive presurgical investigation. Post-surgical specimen from one patient was further explored using multi-electrode array recordings *in vitro* in order to explore the microscopic organization of the locally generated epileptiform activity.

The goal of the study is to offer a multilevel description of this challenging epileptogenic pathology with particular emphasis on the relationship between neurophysiological and neuropathological features.

Methods

We screened all patients who underwent epilepsy surgery between January 2010 and December 2020 in the Pitié-Salpêtrière Hospital and for which neuropathological examinations were available. On a total of 323 patients, we identified two patients whose histological examination revealed microscopic abnormalities compatible with FNL. Both patients underwent a complete presurgical evaluation in the Epileptology Unit of the Pitié-Salpêtrière Hospital. It included 3T brain MRI, 27-electrode long-term video-EEG recordings (MicroMed System, Italy) and interictal ¹⁸FDG-PET. Interictal and ictal (SISCOM) Tc-99m-HMPAO SPECT evaluation were performed in both patients. For patient 1, we conducted an intracerebral SEEG investigation exploring the right temporal, parietal and occipital lobes. Nine intracerebral electrodes (AdTech®) were inserted using the robotic ROSA® device (Medtech). Signals were continuously and synchronously recorded at 4kHz using a hardware filter at 0.01Hz (Atlas Recording System; NeuraLynx, Tucson, AZ, USA). Post-implantation electrode locations were based on a pre-implantation 3T 3D-MRI, post-implantation 1.5T 3D-MRI and CT scan, integrated using the Epiloc toolbox, an in-house developed plugin for the 3D-Slicer visualization software.

The study design and report are in accordance with the STROBE statement (Cuschieri, 2019).

Neuropathology

After surgery, brain specimens were formalin-fixed and paraffin-embedded. Three micrometers-thick tissue sections were studied by hematoxylin-eosin, Periodic Acid Schiff (PAS) and Luxol blue stainings or were processed for immunostainings by a fully automated stainer Ultra (Ventana, Roche) using diaminobenzidine as a chromogen and the following primary antibodies and dilutions: monoclonal mouse anti-non phosphorylated neurofilament SMI32 (Biolegend, 1/1000), mouse monoclonal anti-p62 (Becton Dickinson, 1/500), polyclonal rabbit anti-glutamate decarboxylase 65 & 67 (Sigma, 1/3000).

Human tissue and multi-electrode recordings

A written consent was obtained for the *in vitro* study, according to a procedure validated by the national ethical committee (TIPI project, INSERM C16-16).

Cortical specimens collected in the operating room were immediately transported in ice-cold (0-4°C), oxygenated solution (O₂/CO₂ 95/5%), containing (in mM): N-methyl-d-glucamine 93, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 30, HEPES 20, D-glucose 20, ascorbic acid 5, sodium pyruvate 3, MgSO₄ 10 and CaCl₂ 0.5 (300-310 mOsm, pH 7.4) and transported within 15 minutes to the laboratory. Transverse cortical slices (400 µm thick) were prepared in the same solution using a vibratome (HM650V, Microm). They were maintained at 37°C in an interface chamber containing artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM): D-glucose 10, KCl 3.5, NaHCO₃ 26, NaH₂PO₄ 1.25, NaCl 126, CaCl₂ 1.6 and MgCl₂ 1.2 (290 mOsm), equilibrated with 5% CO₂ in 95% O₂.

Multielectrode array recordings were performed using a MEA2100 station (Multi Channel Systems) equipped with a 120-microelectrode array chamber (12x12 layout, 30 µm titanium nitride electrodes spaced 100 µm). Slices were maintained in the recording chamber using a home-made platinum-nylon harp and superfused with pre-warmed (37°C) oxygenated ACSF at a rate of 6 ml/min. Slices were imaged using a video-microscope table (MEA-VMT1, Multi Channel Systems) in order to register the location of electrodes with respect to the slice. Extracellular signals were acquired at a sampling rate of 10 kHz and post-hoc filtered with a low pass Bessel filter (order 2; 40Hz) using Multi Channel Experimenter (MultiChannelSystems). Analyses were performed offline using homemade software (Matlab, The Mathworks).

Results

Clinical presentation

Patient 1, a 24-year-old woman, suffered from focal epilepsy since the age of 12. Seizures consisted of dizziness and spatiotemporal disorientation, followed by loss of awareness and atonia, sometimes associated with falls. Patient 2, a 30-year-old woman, developed focal seizures since the age of three months. A mild right hemiplegia appeared during the second year of life. Seizures were controlled by pharmacological treatment until the age of 26, then the patient experienced a progressive increase in seizure frequency. Seizures usually consisted of paresthesia of the right hemi-body, including the face, followed by hypertonic contraction and then clonus of the upper limb. Awareness was preserved.

Structural and Metabolic imaging

In patient 1, brain MRI was normal (Figure 1a, left). Brain ^{18}F FDG-PET found a right temporal hypometabolism including the lateral cortex, up to the parieto-temporal junction and the pericentral region (Figure 1a, middle panel). Ictal versus interictal SPECT (SISCOM) disclosed a hyperperfused area in the right temporopolar cortex, predominating in the superior temporal gyrus (STG; Figure 1a right). In patient 2, brain MRI demonstrated a focal blurring at the cortico-subcortical junction of the bottom of the superior left frontal sulcus (Figure 1d, left panel). This lesion was hypometabolic on ^{18}F FDG-PET (Figure 1d, middle). Ictal versus interictal SPECT disclosed a cortical hyperperfusion involving the lesion, extending to the homolateral inferior pre-central cortex (Figure 1d, right panel).

EEG investigations

In patient 1, surface EEG disclosed spikes and sharp waves on the right temporal lobe. Intracranial EEG investigation identified a highly active focus of interictal epileptiform discharges in the posterior part of the right STG (Figure 1b). They consisted of quasi-continuous periodic spikes and spikes and waves with superimposed short-lasting bursts of fast activity during wakefulness.

The latter increased dramatically during non-REM sleep, and appeared as short-interval (1-2 s), periodic discharges at 80 Hz oscillations (brushes), alternating with transient suppression of background activity (Figure 1b). Seizures consisted of low voltage fast activity and originated from the same contacts where the interictal discharges (IIDs) were identified. (Figure 1c). In patient 2, scalp EEG showed quasi-continuous rhythmic (6-7 Hz), low amplitude spikes/sharp waves interictal epileptiform discharges, on the left fronto-central electrodes (Figure 1e).

Seizures mainly occurred during sleep and consisted of a left fronto-central rhythmic ictal activity with a “sawtooth” morphology (Figure 1e, right panel).

Surgery Outcome

In patient 1, surgical cortectomy removed the posterior part of right STG (Figure 2a, left panel). In patient 2, surgery removed the bottom of the posterior part of the superior left frontal sulcus (Figure 2a, right panel). No significant reduction of seizure frequency was achieved after one year since surgery (ILAE Class 5) in both patients. These results are in line with previous observation on FNL surgery [1].

Neuropathological study

In both patients, neuropathological analysis of post-surgical specimens disclosed enlarged, pyramidal or globoid neurons resembling DANs (Figure 2b). The cytoplasm of DANs was markedly distended, showing intracellular granular material on hematoxylin-eosin. Granular material was both PAS and Luxol blue positive, suggesting excessive lipofuscin accumulation. All DANs were negative for anti-GAD staining, suggesting that they were not interneurons (Figure 2c). p62—a protein involved in ubiquitin-proteasome system and in autophagy [4,5]—was weakly expressed in DANs, in contrast to the strong expression found in abnormal cells of FCDIIb (figure 2c) [1]. The somata of lipofuscin-containing DANs were surrounded by crown-like, GAD-immunopositive puncta, compatible with peri-somatic GABAergic presynaptic buttons. Interestingly, no normal pyramidal neuron in the specimen showed a similar morphological feature (Figure 2c).

In vitro electrophysiological recordings from post-surgery human tissue from patient 1.

In order to correlate these morphological features with neuronal activity, we next performed *in vitro* recordings from postsurgical specimens from patient 1 using multielectrode arrays. Spontaneous, periodic (1.2 Hz), interictal-like discharges (IILDs) were identifiable in a restricted area of the slice (red electrodes in Figure 3a). Upon application of a pro-convulsive extracellular solution (9 mM K⁺; 0.25mM Mg²⁺, 1.6mM Ca²⁺), the frequency of IILDs increased by 27 % whereas their amplitude decreased by 58 % (Figure 3b). However, no ictal-like activity was induced outside the spontaneously active area. Importantly, this area also displayed the highest density of lipofuscin-containing DANs (Figure 3b, red arrow; Figure 3c, red contoured square) which were virtually absent from the silent areas (Figure 3b, green arrow; Figure 3d, green contoured square). These findings suggest a tight correlation between the density of lipofuscin-containing neurons and epileptogenicity. Finally, since DANs were

surrounded by a high density of putative perisomatic GABAergic synaptic boutons, we tested the role of GABA signaling in the generation of epileptic activity. Thus, application of the specific GABA_A receptor antagonist gabazine (10 μM) resulted in the complete suppression of epileptiform activity detected on previously active electrodes and the emergence of slow, high-amplitude LFP oscillations in the whole slice.

Discussion

FNL is a rare and recently described pathology [1,2]. According to the reports of a total of seven patients, FNL was systematically located in the frontal lobes. Here, we report that FNL can also be identified in the temporal lobe, as shown in one of our two patients.

Previous reports did not provide details on EEG findings. Here, we report, in both patients, strikingly focal and rich interictal EEG activities. They consisted of focal rhythmic or periodic interictal epileptiform discharges resembling those described in FCDIIb [6,7]. However, in line with the previous reports on FNL [1], surgical outcome was not satisfying in our two patients, when compared to that observed with FCD patients [1,2,7]. It is not clear whether these differences are due to a greater difficulty in correctly delineating and resecting the affected tissue or to differences in network organizations around the lesion as compared with FCDIIb.

Neuropathological examination of post-operative tissues from both patients showed intraneuronal lipofuscin accumulation within dysmorphic neurons, a hallmark of FNL. In line with a previous report, post-surgical tissues from our patients revealed a cortical and juxtacortical location of FNL 1 [1,2]. In addition, all DANs were GAD-immunonegative, suggesting they were not GABAergic interneurons (Fig 2c). In contrast, their soma were surrounded by a crown-like zone of dense GABAergic presynaptic buttons. This suggested GABAergic interneurons may either contribute to the epileptogenicity of FNL or, impose an inhibitory restraint to the propagation of epileptiform activity [11-13], or both. A similar organization was reported in FCDIIb, where interneurons provide increased GABAergic innervation of DANs [8,9]. In addition, hypertrophic basket formations established by putative parvalbumin interneurons also surround DANs in FCDs [10].

The contribution of GABAergic interneurons to epileptic activity is, however, a highly dynamic and multifaceted process. Thus, whereas GABA-mediated inhibition may prevent the spread of epileptic activity [11-13], GABA_A receptor-mediated currents can also paradoxically promote epileptiform activity [14] due to altered neuronal chloride homeostasis resulting in depolarizing

and excitatory GABA signaling [19, 20]. Consistent with this scenario, spontaneous seizure generation *in vivo* was associated with increased GABAergic interneuron activity preceding pyramidal neuron activity [15]. In human FCD tissue recorded *in vitro*, epileptiform activity was initiated by synchronizing mechanisms relying on GABA_A receptors [15, 17, 18]. Our *in vitro* data from FNL resective tissue demonstrate that the epileptogenic zone is confined within a highly restricted area enriched in lipofuscin-rich neurons. In addition, we showed that spontaneous IILDs were blocked by the GABA_A receptor antagonist gabazine which, however, induced widespread, large amplitude LFP oscillations beyond the limits of the spontaneously active area.

These observations suggest GABA signaling in FNL tissue may both contribute to the generation of interictal-like activity and constrain the spreading of synchronous, epileptiform activity.

In conclusion, we suggest that FNL is not exclusive of FLE but can be found in other types of focal epilepsies such as temporal lobe epilepsy. Although FNL and FCDIIb represent two distinct pathologies, they share some neuropathological and electrophysiological features. Histological analyses reveal an abnormal density of GABAergic terminals around the soma of lipofuscin-containing DANs, suggesting a role of GABAergic interneurons in epileptic activities. *In vitro* electrophysiological recordings from resective tissue further supported this hypothesis.

Conflict of interests

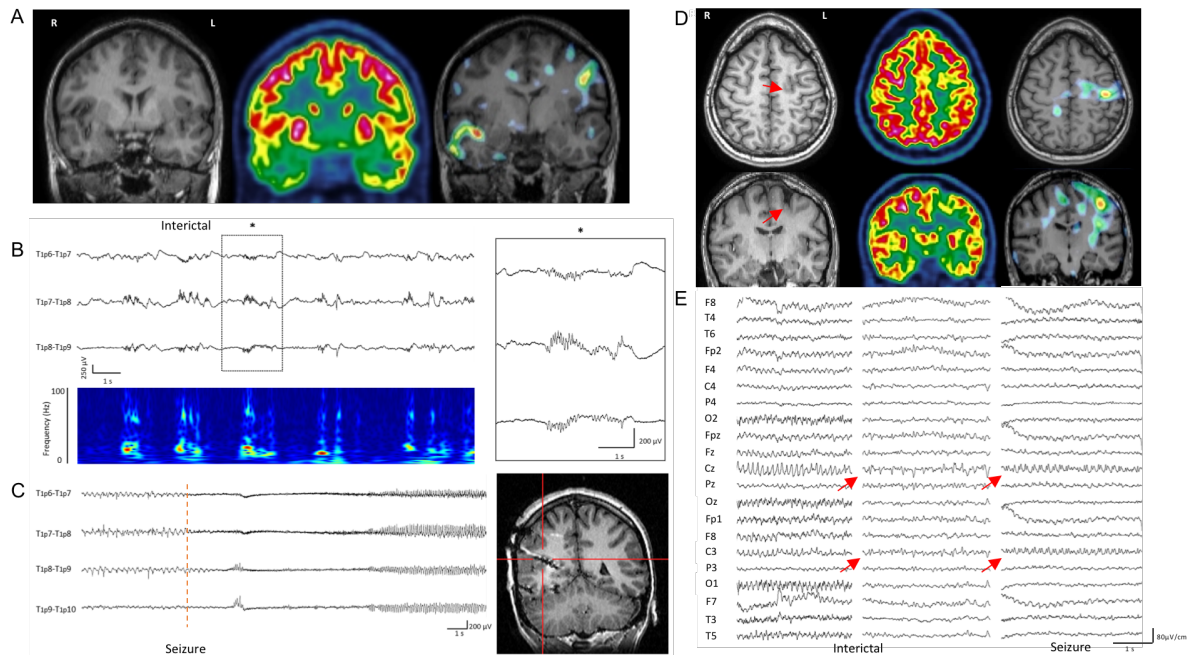
The authors report no conflict of interests. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

References

1. Liu JY, Reeves C, Diehl B, et al. Early lipofuscin accumulation in frontal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 2016;80(6):882-895.
2. Mhatre R, Jagtap SA, Kurwale N, Santhoshkumar R, Deshmukh Y, Mahadevan A. Frontal lobe epilepsy with focal neuronal lipofuscinosis – Case report of a rare entity. *Epilepsy Behav Rep*. 2020; 14:100369
3. Blümcke I, Thom M, Aronica E, et al. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia* 2011;52(1):158-174.
4. Iyer A, Prabowo A, Anink J, et al. Cell injury and premature neurodegeneration in focal malformations of cortical development. *Brain Pathol* 2014;24:1-17.
5. Ichimura Y, Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol* 2010;32:431-436.
6. Epitashvili N, San Antonio-Arce V, Brandt A, et al. Scalp electroencephalographic biomarkers in epilepsy patients with focal cortical dysplasia. *Ann Neurol*. 2018;84(4):564-575.
7. Tassi L, Garbelli R, Colombo N, et al. Electroclinical, MRI and surgical outcomes in 100 epileptic patients with type II FCD. *Epileptic Disord*. 2012;14(3):257-66.
8. Garbelli R, Munari C, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Galli C, Bramerio M, Mai R, Battaglia G, Spreafico R. Taylor’s cortical dysplasia: a confocal and ultrastructural immune histochemical study. *Brain Pathol*. 1999; 9:445–461.
9. Tassi L, Colombo N, Garbelli R, Francione S, Lo Russo G, Mai R, Cardinale F, Cossu M, Ferrario A, Galli C, Bramerio M, Citterio A, Spreafico R. Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain*. 2002; 125: 1719–1732.
10. Alonso-Nanclares L, Garbelli R, Sola RG, Pastor J, Tassi L, Spreafico R, DeFelipe J. Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. *Brain*. 2005; 128, 58–173.
11. Schevon CA, Weiss SA, McKhann G, Goodman RR, Yuste R, Emerson RG. Evidence of an inhibitory restraint of seizure activity in humans. *Nat. Commun*. 2012;3:1060.
12. Trevelyan AJ, Sussillo D, Watson BO, Yuste R. Modular propagation of epileptiform activity: evidence for an inhibitory veto in neocortex. *J Neurosci*. 2006; 26(48):12447-55.

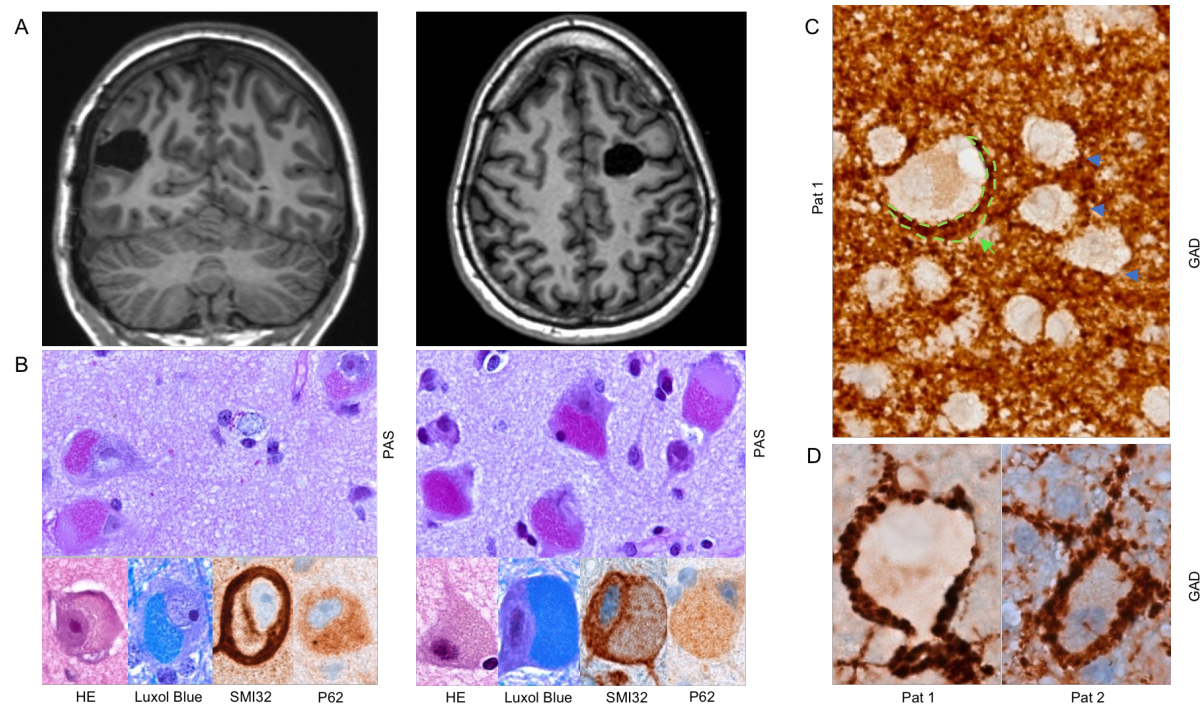
13. Trevelyan AJ, Sussillo D, Yuste R. Feedforward inhibition contributes to the control of epileptiform propagation speed. *J Neurosci*. 2007; 27:3383–7.
14. Avoli M and de Curtis M. GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *Prog Neurobiol*. 2011; 95(2): 104–132.
15. Elahian B, Lado NE, Mankin E, Vangala S, Misra A, Moxon K, Fried I, Sharan A, Yeasin M, Staba R, Bragin A, Avoli M, Sperling M, Engel J, Weiss SA. Low-voltage Fast Seizures in Humans Begin With Increased Interneuron Firing. *Ann Neurol*. 2018;84(4):588-600.
16. Andre VM, Flores-Hernandez J, Cepeda C, Starling AJ, Nguyen S, Lobo MK, Vinters HV, Levine MS, Mathern GW. NMDA receptor alterations in neurons from pediatric cortical dysplasia tissue. *Cereb Cortex*. 2004; 14: 634–646.
17. Cepeda C, Chen JC, Wub JY, Fisher RS, Vinters HV, Mathern GW, Levine MS. Pacemaker GABA synaptic activity may contribute to network synchronization in pediatric cortical dysplasia
18. Avoli M, Louvel J, Mattia D, Olivier A, Esposito V, Pumain R, D'Antuono M. Epileptiform synchronization in the human dysplastic cortex. *Epileptic Disord*. 2003; 5 (Suppl 2):45–50
19. Lévesque M, Ragsdale D, Avoli M. Evolving Mechanistic Concepts of Epileptiform Synchronization and their Relevance in Curing Focal Epileptic Disorders. *Curr Neuropharmacol*. 2019;17(9):830-842.
20. Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R. On the Origin of Interictal Activity in Human Temporal Lobe Epilepsy in Vitro. *Science*. 2002; 298:1418-1421.

Figure 1. Imaging, metabolic and electrophysiological features of two epileptic patients with a final diagnosis of FNL.



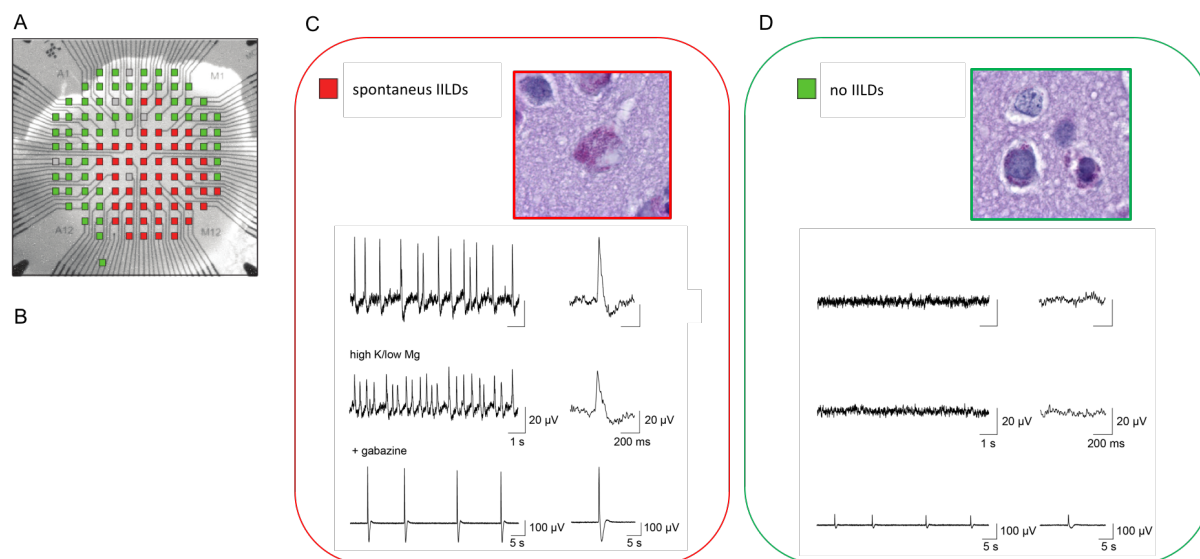
A, Brain MRI and metabolic imaging from patient 1. *left panel:* Anatomical MRI showing no obvious lesion. *Middle Panel:* interictal PET showing hypometabolism in the right temporal lobe. *Right panel:* Ictal versus interictal SPECT showing an area of hyperperfusion in the right temporopolar cortex, in particular within the superior temporal gyrus. The radiotracer was injected 27 seconds after the seizure onset. **B,** Interictal pattern recorded from contacts 6 to 9 of the intracerebral electrode located in the right superior temporal gyrus (see brain location on the right part of panel C). Interictal activity consisted of periodic discharges of fast oscillations superimposed on isolated or repetitive slow waves, sometime entangled with isolated epileptic spikes. The insert shows a magnification of the sEEG trace enclosed in the dotted rectangle. T1p: T1= superior temporal gyrus, p= posterior. sEEG signals are showed in bipolar montage. *Lower panel:* Time-frequency analysis (TFA) of interictal sEEG signal showed overhead (T1p7-8 channel). TFA showed periodic modulation of frequency power at around 30Hz together with spots of higher frequency power up to 80 Hz. **C,** *Left panel:* Representative trace of a seizure from patient 1. Seizures were found to originate from brain tissue around the contacts 6-7-8 of the electrode T1p, and consisted of a low voltage fast activity. *Right panel:* Anatomical MRI showing the trajectory of the intracerebral electrode exploring the posterior part of the right superior temporal lobe. **D,** Brain MRI and metabolic imaging from patient 2. *Left, upper and lower panel:* Axial and coronal view of brain MRI. Discrete focal blurring of the cortico-subcortical junction of the bottom of the superior left frontal sulcus (red arrow).

Middle, upper and lower panel: Axial and coronal view of the ^{18}F FDG-PET showing hypometabolism of the left superior frontal sulcus. *Right, upper and lower panel:* Axial and coronal view of the ictal versus interictal SPECT disclosing an area of cortical hyperperfusion centered on the lesion and the left inferior pre-central cortex. **E,** Representative traces of interictal and ictal scalp EEG of patient 2. EEG showed intermittent low amplitude rhythmic spiky activity at 6-7 Hz, on the left fronto-central and anterior midline electrodes (*left panel*). Interictal activity can also acquire a pseudo-periodic, short interval, appearance (*middle panel*). During seizures (*right panel*), the rhythmic ictal abnormalities showed a peculiar “sawtooth” morphology. EEG signals are showed with an average reference montage.

Figure 2. Neuropathological analysis of postsurgical specimens from patients 1 and 2.

A, brain MRI showing the postsurgical cavity. **B**, *Upper images*: Periodic Acid Schiff (PAS) coloration. In both patients dysmorphic-appearing neurons (DANs) showed intracytoplasmic granular PAS accumulation. *Lower images*: hematoxylin-eosin (HE) and Luxol blue staining, revealing lipofuscin material in DANs, together with strong ring-like immunolabeling of neurofilament SMI32 and weak positivity for p62. **C**, GAD immunostaining reveals that DANs are not GABAergic neurons but are surrounded by high-density, perisomatic puncta, compatible with presynaptic GABAergic boutons. This was observed only around DANs (dotted green lines with arrow) but not neurons with a normal appearance (blue arrows). **D**, Detail of perisomatic, GAD-immunopositive boutons around DANs found in both patients.

Figure 3. Gabazine suppresses spontaneous interictal-like discharges (IILDs) recorded *in vitro* in human FNL tissue.



A, Example of a cortical slice from a post-operative tissue, recorded on a 120-channel multi-electrode array. The schematic representation of the electrode layout is superimposed on the image of the slice. Electrodes recording spontaneous IILDs are shown in red whereas those without IILDs are shown in green. Noisy electrodes are represented in grey and were not used for recording. Note that the epileptogenic zone is restricted to a portion of the slice. **B**, Same slice as in **A**, stained with PAS for lipofuscin visualization. Arrows indicate the sites from which insets in panels **C-D** were obtained. **C-D**, Representative local field potential recordings from both spontaneously active (**C**, red) and inactive (**D**, green) areas from the slice shown in panels **A-B**. Insets, magnification of the areas indicated with red (**C**) and green (**D**) arrows, respectively, in panel **B**. Note the presence of a dysmorphic neuron containing a strong intracytoplasmic lipofuscin staining (purple) in the spontaneously active area. Top traces, spontaneous IILDs represented on different timescales, recorded from a red (**B**) but not a green (**C**) electrode. Middle traces, upon perfusion with a pro-convulsive solution (9 mM K^+ , 0.25 mM Mg^{2+} , 1.6 mM Ca^{2+}), the frequency of IILDs increased while their amplitude was reduced. No activity was induced in areas without spontaneous IILDs. Lower traces, upon addition of gabazine (10 μ M), IILDs were suppressed and replaced with large amplitude, rhythmic, LFP oscillations spreading throughout the slice.

Résumé

L'état de mal épileptique (EME) est l'une des principales urgences neurologiques et se définit par l'absence d'arrêt spontané d'une crise d'épilepsie. Cette pathologie concerne chaque année, en France, près de 30 000 personnes et est associée à une importante mortalité. En dépit d'une prise en charge thérapeutique adaptée, dans 25% des cas l'EME est réfractaire à l'ensemble des traitements antiépileptiques. La persistance des crises expose le patient au risque d'excitotoxicité, de neuro-inflammation et de mort neuronale, à l'origine de séquelles neurologiques dont la récupération à distance de l'EME est incertaine.

Mon travail de thèse a eu pour objectifs (i) de confirmer la valeur diagnostique de biomarqueurs biochimiques, (ii) d'étudier leur capacité à refléter les anomalies électroencéphalographiques et à prédire le risque de récurrence de crise, (iii) d'identifier de nouvelles voies physiopathologiques pouvant expliquer les conséquences délétères de l'EME, (iv) de proposer une stratégie neuroprotectrice et (v) de développer des scores composites clinico-biologiques permettant d'optimiser l'évaluation pronostique de tout patient admis pour un EME.

J'ai premièrement observé une augmentation des concentrations sériques de la protéine S100-bêta et défini un seuil diagnostique à 0,09 ng/mL permettant de conclure à raison à un EME pour près de 84% des patients. La Neuron Specific Enolase (NSE) présente également des concentrations élevées chez les patients en EME. J'ai mis en évidence que cette enzyme présente principalement un intérêt pour le suivi des patients : j'ai démontré dans une cohorte de patients admis pour un EME réfractaire que la NSE était capable de refléter les anomalies électroencéphalographiques et qu'une augmentation de plus de 15% des concentrations entre deux mesures était associée à une recrudescence des crises pour 80% des patients.

Parallèlement, j'ai observé, par une approche translationnelle, que l'EME s'accompagnait d'une modification du métabolisme du cholestérol. J'ai mis en évidence une diminution précoce des concentrations de 24-hydroxycholestérol, une synthèse accrue secondaire, cérébrale et périphérique, de cholestérol et des modifications de l'homéostasie lipidique favorisant un stockage en excès du cholestérol. Ces travaux ont ouvert la voie à l'utilisation d'un traitement hypocholestérolémiant comme stratégie neuroprotectrice dans l'EME réfractaire.

J'ai ensuite confirmé la capacité de la simvastatine à réduire la mort neuronale et la gliose dans les suites d'un EME induit chez la souris par une injection intrahippocampique de kaïnate.

Enfin, j'ai construit, à l'aide de modèles statistiques, des scores mixtes clinico-biologiques permettant d'optimiser l'évaluation pronostique pour tout patient admis en réanimation pour un EME. J'ai proposé deux outils permettant de prédire le risque qu'un patient présente une perte d'autonomie et j'ai démontré que l'association de variables biologiques permettait de prédire le risque qu'un patient décède en sortie de réanimation. Pour la première fois, j'ai également proposé un outil permettant d'estimer le degré de dégradation en sortie de réanimation et j'ai démontré qu'un score composite clinico-biologique pouvait prédire la récupération à distance de l'EME pour 91% des patients et la présence d'une atteinte persistante pour 83% des patients.

Mon travail de thèse a permis de démontrer l'intérêt des biomarqueurs biochimiques pour faciliter le diagnostic, le suivi et l'évaluation pronostique des patients en EME et l'importance de l'étude des voies physiopathologiques pour proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques de neuroprotection.

Mots clés : Biomarqueurs ; Cholestérol ; État de mal épileptique ; NSE ; pronostic ; protéine S100-bêta.