HAL
open science

Inflammation et infiltration monocytaire associées à la dégénérescence neuronale induite par un status epilepticus chez le rat

Fabrice Navarro y Garcia

To cite this version:

Fabrice Navarro y Garcia. Inflammation et infiltration monocytaire associées à la dégénérescence neuronale induite par un status epilepticus chez le rat. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00195393

HAL Id: tel-00195393

https://theses.hal.science/tel-00195393

Submitted on 10 Dec 2007

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

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

Université Claude Bernard Lyon 1

N° d'ordre : 230 - 2007 Année 2007

THÈSE présentée

devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention du DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 15 novembre 2007 par

Monsieur Fabrice NAVARRO

« Inflammation et infiltration monocytaire associées à la dégénérescence neuronale induite par un *status epilepticus* chez le rat »

Directeurs de thèse : Pr. Jean-Marc PEQUIGNOT
Dr. Laurent BEZIN

JURY :

M. le Pr. Philippe RYVLIN,	Président
M. le Pr. Denis VIVIEN,	Rapporteur
M. le Dr. Jean-Jacques RISSO,	Rapporteur
M. le Pr. Jean-Jacques MADJAR,	Examinateur
M. le Dr. Pierre SZEPETOWSKI,	Examinateur
M. le Pr. Jean-Marc PEQUIGNOT	
M. le Dr. Laurent BEZIN	

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université	**M. le Professeur L. COLLET**
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J.F. MORNEX
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. le Professeur J. LIETO
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. SIMON
Secrétaire Général	M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. O. ROBIN
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur MATILLON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique	Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur H. PINON
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur M. EGEA
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
UFR STAPS	Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J. LIETO
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
IUT B	Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Remerciements

Cette thèse de doctorat a été préparée entre le 1er octobre 2003 et le mois d'octobre 2007, période pendant laquelle j'ai été financé par une allocation de recherche MENRT et par un contrat de moniteur au sein de l'Université Claude Bernard Lyon I. La dernière année a été financée par un contrat ATER de l'Université Claude Bernard Lyon I.

Tout d'abord, je tiens à remercier les Professeurs Jean-Marc PEQUIGNOT et Hervé BARRE pour m'avoir permis d'accomplir mon travail de recherche dans de bonnes conditions expérimentales et dans un contexte scientifique favorable au sein du laboratoire CNRS/UCBL 5123. En particulier, je remercie pleinement le Professeur PEQUIGNOT pour son enthousiasme constant à l'égard de ce projet, pour ses remarques constructives sur les résultats expérimentaux et sa gentillesse de chaque instant.

Je remercie le Docteur Jean Jacques RISSO du laboratoire de neurochimie de l'IMNSSA d'avoir accepté d'expertiser ce rapport de thèse et d'avoir manifesté tant d'intérêt scientifique sur l'ensemble de ce travail. Je remercie également le Professeur Denis VIVIEN du centre de recherche Cycéron d'avoir évalué mon rapport de thèse et accepté de faire partie de mon jury. Merci à ces deux rapporteurs pour leurs commentaires qui ont permis d'améliorer le manuscrit. En particulier, j'exprime toute ma gratitude au Professeur Jean-Jacques MADJAR du CGMC pour le temps qu'il a passé à étudier en détails mon rapport de thèse et je le remercie vivement pour l'ensemble de ses corrections et de ses conseils qui ont grandement contribué à améliorer la lecture du manuscrit. Cette dernière étape de correction aura été très utile à ma formation et aura grandement contribué à ma maîtrise de la langue française et de ses subtilités, ainsi qu'à améliorer mon style d'expression écrite (expression ? non plutôt synthèse ou production…). Enfin, je remercie le Professeur Pierre SZEPETOWSKI pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également le Professeur Philippe RYVLIN d'avoir apporté tout au long de ce travail de thèse son regard d'épileptologue, très utile à notre équipe pour envisager les

applications cliniques de nos résultats expérimentaux. Je le remercie d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie avec une attention toute particulière mon directeur de thèse, le Docteur Laurent BEZIN pour m'avoir accompagné avec enthousiasme au cours de la réalisation de ce travail de recherche. Son sens critique a été très utile dans l'approfondissement de ce projet, qui a été une véritable aventure scientifique, mais aussi humaine. Je lui suis reconnaissant de la confiance qu'il m'a accordée et je le remercie sincèrement pour la formation de qualité qu'il m'a prodiguée au cours de ces dernières années. Merci pour tout ce qu'il m'a transmit, comme par exemple son attrait pour l'innovation, qui me suivront toujours dans mes choix professionnels.

Je remercie également très chaleureusement tous les membres de l'équipe 1 de l'UMR 5123, avec qui j'ai passé d'agréables moments ces dernières années : Béatrice GEORGES, Colette MOULIN, Marion LE CAVORSIN MOREAU, Sandrine BOUVARD, Frédérique COHEN-ADAD, Chantal BONNET, Anne MORALES, Jacques BODENNEC, Amor BELMEGUENAI. Merci à vous tous pour votre soutien. Merci à Colette, Béatrice et Marion pour votre aide précieuse. Sans vous, ce travail ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui. Je n'oublie pas non plus le groupe du « tronc cérébral » : Yvette DALMAZ, Silvia ARANEDA, Luc QUINTIN, Emil TOADER, Andréi CIVIDJIAN et Kunio KITAHAMA.

Je tiens à remercier aussi l'ensemble des étudiants de l'équipe avec qui j'ai partagé des moments inoubliables : Naïck BOURGOIN, Aurélien BOUSSOUAR, Rafik DEY, Aèl LAGLAINE, Rafaat FARES, Céline HAMMELIN, Hayet KOUCHI, Jérémie NADAM, David PERRIN, Pascal SANCHEZ, Hassan SKAIKY et Christophe SOULAGE. Un grand merci à Naïck pour la bonne humeur qu'elle a apportée dans le bureau et pour son aide au cours des expérimentations sur le rat. Merci à Jérémie pour son amitié et pour ses conseils avisés sur les présentations Powerpoint. Merci à Pascal pour son soutien technique au cours de la dernière année de ce travail. Ce fut un véritable plaisir d'échanger avec lui. Je leur souhaite à tous beaucoup de réussite pour l'avenir.

J'exprime toute ma sympathie à l'égard des enseignants chercheurs de l'UMR 5123. Mon initiation à l'enseignement supérieur a été à leurs côtés un véritable plaisir. En

particulier, merci à Christine BERTHIER, Robert BONVALET, Christophe CHOUAB, Hichem MERTANI et Anne MORALES.

Enfin, j'exprime toute ma gratitude à mes proches, familles et amis. A tous ceux qui ont été près de moi. Merci à toi Maman pour ton soutien constant tout au long de ce chemin qui m'a mené à la thèse, merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir été une source de réconfort. Merci à mes deux sœurs, Laurence et Céline, à mon petit frère Tony, à mon beau-frère Radouane et à mes merveilleux neveux, Yanice et Ilyan, pour être toujours au plus près de moi. Merci aussi à ma tante Monique de m'avoir toujours encouragé à poursuivre mes études. Merci à Bertrand, Malik, Fabien et Francis pour leur amitié soutenue et pour avoir « feinté » s'intéresser réellement à mes recherches. Merci pour les nombreuses heures que vous avez passé à m'attendre quand j'étais au laboratoire. Merci aussi à Sandro et à Cal, mes confrères inoubliables de BCP. Merci à ma belle famille, Nicole et Laroussi, pour le réconfort qu'ils m'ont procuré ces dernières années et pour leurs encouragements. Merci aussi à mon beau frère Mehdi et à Laurence. Je pense aussi à mon père et je le remercie d'avoir su éveiller ma curiosité quand j'étais enfant, elle m'a été précieuse par la suite. Enfin, un grand merci à ma femme pour son soutien inconditionnel, pour son réconfort de chaque instant et pour son aide précieuse dans la mise en forme de ce manuscrit. Merci au « petit bout » qui pousse en elle d'être resté sage dans ces moments. Quelques lignes de plus sur cette page ne sauraient exprimer combien je suis heureux et m'estime chanceux de tous vous avoir à mes côtés.

A vous tous merci pour votre soutien.

A ma grand-mère Denise,

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS *5*

INTRODUCTION GÉNÉRALE *7*

HISTORIQUE SCIENTIFIQUE *10*

I. Les épilepsies du lobe temporal et l'épileptogenèse 10

I.A. Les épilepsies du lobe temporal 10

I.A.1. Généralités 10

I.A.2. Les observations anatomiques chez l'homme 11

I.A.2.a. L'apport de l'imagerie médicale 11

I.A.2.b. Anatomie de l'hippocampe 12

I.A.2.c. Caractérisation de la sclérose de l'hippocampe chez l'homme 14

I.B. Les modèles animaux de la neurodégénérescence sélective de l'hippocampe associée à l'épileptogenèse 16

I.B.1. Induction du *SE* par voie pharmacologique 16

I.B.2. Induction du *SE* par voie électrique 17

II. La neuro-inflammation : mécanisme déclencheur de l'épileptogenèse ? 22

II.A. Les médiateurs cellulaires de la réponse inflammatoire cérébrale 22

II.A.1. La microglie 22

II.A.1.a. Préambule 22

II.A.1.b. Origine et maintien à l'âge adulte de la population microgliale 22

II.A.1.c. Rôles physiologiques de la microglie 25

II.A.2. Les cellules périvasculaires et les péricytes 25

II.A.2.a. Les cellules périvasculaires 25

II.A.2.b. Les péricytes 26

II.A.3. Les cellules dendritiques 27

II.A.4. Identification des différentes catégories de cellules immunocompétentes 27

II.A.5. Le concept de microglie activée 29

II.A.6. Microgliose réactionnelle 30

II.B. Les cytokines pro-inflammatoires : des médiateurs moléculaires de la réponse inflammatoire cérébrale 31

II.B.1. Présentation et expression cérébrale 31

II.B.1.a. L'interleukine 1 31

II.B.1.b. Le facteur de nécrose tumorale α 33

II.B.1.c. L'interleukine-6 34

II.B.2. Régulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires au cours de l'épileptogenèse 35

II.B.3. Rôles des cytokines pro-inflammatoires au cours de l'épileptogenèse ? 36

II.B.3.a. Les cytokines pro-inflammatoires sont-elles pro ou anti-épileptogènes ? 36

II.B.3.b. Les cytokines pro-inflammatoires sont-elles neurotoxiques ou neuroprotectrices ? 39

II.B.3.c. Les cytokines pro-inflammatoires stimulent la réponse astrocytaire 40

II.C. Focalisation sur l'infiltration de monocytes dérivés du sang dans le parenchyme cérébral 41

II.C.1. Les chimiokines : Signature moléculaire de l'infiltration de monocytes dérivés du sang 42

II.C.2. Mécanismes d'entrée dans le cerveau : rôles des protéases ? 43

III. Le substrat de l'héparanase : les chaînes de sulfate d'héparnae 50

III.A. Présentation rapide des chaînes de sulfate d'heparane 50

III.A.1. Chaînes de sulfate d'héparane et classification 50

III.A.2. Le squelette protéique 50

III.A.3. Les chaînes de sulfate d'héparane 52

III.A.3.a. Initiation de la chaîne : 52

III.A.3.b. Polymérisation de la chaîne : 52

III.A.3.c. Modifications séquentielles : 52

III.B. Propriétés attribuées aux chaînes de sulfate d'heparane 54

III.B.1. Contrôle de la viscosité de la matrice extracellulaire 54

III.B.2. Liaison à des protéines extracellulaires qui présentent un domaine de fixation aux chaînes de sulfate d'héparane 55

III.B.2.a. Chaînes de sulfate d'héparane : réservoir extracellulaire en facteurs actifs et contrôle de leur biodisponibilité extracellulaire 55

III.B.2.b. Chaînes de sulfate d'héparane : co-récepteurs et modulateurs des voies de signalisation 56
III.B.2.c. Chaînes de sulfate d'héparane : récepteurs pour une internalisation et un recyclage 57
III.C. Implication des chaînes de sulfate d'heparane dans l'infiltration des leucocytes au cours de l'inflammation 57
III.C.1. Rôles d'adhérence des chaînes de sulfate d'héparane portées par les syndécanes et glypicanes des cellules endothéliales. 57
III.C.2. Les chaînes de sulfate d'héparane de la membrane basale des capillaires sanguins jouent un rôle de barrière physique à la diapédèse des leucocytes 58

IV. L'héparanase : enzyme de dégradation des chaînes de sulfate d'héparane 64
IV.A. Présentation et caractérisation de l'héparanase 64
IV.A.1. Structure génique et protéique de l'héparanase 64
IV.A.2. Maturation et activation de l'héparanase 65
IV.A.3. Trafic intracellulaire et localisation subcellulaire de l'héparanase 65
IV.B. Implication de l'héparanase dans les processus de migration cellulaire 67
IV.B.1. Cas des métastases cancéreuses 67
IV.B.1.a. Augmentation de la production d'une héparanase active 67
IV.B.1.b. Implication de l'héparanase dans les métastases 67
IV.B.1.c. Sécrétion de l'héparanase 68
IV.B.2. Cas de l'infiltration des cellules immuncompétentes périphériques 68
IV.B.2.a. Synthèse de l'héparanase active par les cellules du système immunitaire 68
IV.B.2.b. Implication de l'héparanase dans l'infiltration tissulaire 69
IV.B.3. Rôles putatifs joués par l'héparanase dans l'infiltration tissulaire de cellules 70
IV.C. L'héparanase dans les tissus non immuns 71
IV.C.1. Hors du système nerveux central 71
IV.C.2. Dans le système nerveux central 72

MATERIELS ET METHODES 76

I. Animaux et conditions d'hébergements 76
I.A. Etudes réalisées sur l'épileptogenèse après *status epilepticus* induit par la pilocarpine chez le jeune rat adulte 76
I.A.1. Pendant la phase d'acclimatation aux conditions d'hébergement 76
I.A.2. A la suite du status epilepticus 77
I.B. Etudes réalisées au cours de la période post-natale et du vieillissement chez le rat mâle 77
I.B.1. Pour la période post-natale 77
I.B.1.a. Concernant les ratons âgés de P2 77
I.B.1.b. Concernant les ratons âgés de P5, P8, P14 et P21 78
I.B.2. Pour l'âge adulte (3 mois) et le vieillissement (12 mois) 78

II. Traitements pharmacologiques 78
II.A. Induction du *status epilepticus* par l'administration intrapéritonéale de pilocarpine 78
II.A.1. Préambule 78
II.A.2. Effets des substances pharmacologiques utilisées 78
II.B. Traitements anti-inflammatoires 79
II.B.1. Administration d'indométhacine 79
II.B.1.a. Préambule 79
II.B.1.b. Protocole du traitement à base d'indométhacine 80
II.B.1.c. Effets reconnus de l'indométhacine 80
II.B.2. Administration de la méthylprednisolone 81
II.B.2.a. Protocole du traitement thérapeutique 81
II.B.2.b. Effets reconnus de la méthylprednisolone 81

III. Groupes expérimentaux 82
III.A. Etudes réalisées sur les animaux soumis a une épileptogenèse experimentale induite par pilocarpine 82
III.A.1. Caractérisation de la réponse inflammatoire au cours de l'épileptogenèse 82
III.A.2. Effets des traitements anti-inflammatoires 83
III.A.3. Etude du comportement au cours du *SE* et suivi des rats au cours de l'épileptogenèse 84
III.B. Expérimentations au cours du développement post-natal et du vieillissement chez le rat 85

IV. Préparations des tissus : procédures *ex vivo* 85
IV.A. Prélèvements et traitements des tissus frais 85
IV.A.1. Prélèvement des cerveaux et microdissections des structures cérébrales 85
IV.A.2. Traitements des échantillons et préparation des ARN totaux 85
IV.A.2.a. Extraction des ARN totaux et purification 85

IV.A.2.b. Vérification de la qualité des ARN ... 86
IV.A.2.c. Vérification de l'absence de contamination par de l'ADN génomique ... 86
IV.B. Préparation des tissus perfusés ... 87
IV.B.1. Fixation des tissus et prélèvement des cerveaux ... 87
IV.B.2. Coupe des cerveaux perfusés ... 87

V. Cellules en culture ... 88
V.A. Conditions de culture ... 88
V.B. Préparation et traitements des cellules ... 88

VI. Dosage des ARNm par RT étalonnée et PCR en temps réel ... 89
VI.A. La réaction de transcription inverse (reverse transcription ou RT) ... 89
VI.A.1. L'étalonnage de la RT ... 89
VI.A.2. La réaction de RT ... 90
VI.B. Amplification quantitative des ADNc d'intérêt par PCR en temps réel ... 90
VI.B.1. Choix des amorces ... 90
VI.B.2. Principe de la réaction de PCR en temps réel ... 90
VI.B.3. Obtention de la gamme étalon ... 91
VI.B.4. Amplification des ADNc d'intérêt ... 92

VII. Dosage des protéines IL-1β et IL-1 Ra et immuno-emprunte de l'héparanase ... 93
VII.A. Extraction des protéines totales sur homogénats tissulaires ... 93
VII.B. Dosage des protéines solubles totales par la méthode de l'acide bicinchoninique. ... 93
VII.C. Dosage ELISA de l'IL-1β et de l'IL-1 Ra ... 94
VII.D. Immuno-emprunte de l'héparanase ... 94

VIII. Etudes histologiques ... 95
VIII.A. Coloration au crésyl violet et recalage anatomique ... 95
VIII.B. Coloration au Fluorojade B ... 95
VIII.C. Détections immunohistochimiques ... 96
VIII.C.1. Production de l'anticorps anti-héparanase de rat ... 96
VIII.C.2. Détection immunohistochimique et révélation à la péroxydase ... 97
VIII.C.2.a. Sur coupes flottantes sans phase de démasquage antigénique à l'acide citrique ... 97
VIII.C.2.b. Sur coupes montées sur lames avec phase de démasquage antigénique à l'acide citrique ... 98
VIII.C.3. Double détection par immuno-fluorescence ... 98
VIII.C.4. Validation de la spécificité de l'anticorps ... 99
VIII.C.5. Détection *in situ* des chaînes de sulfate d'héparane liant l'héparanase ... 100

IX. Analyses et traitements des données ... 101
IX.A. Variables analysées ... 101
IX.A.1. Analyse de la surface de l'hippocampe sur coupes colorées au crésyl violet ... 101
IX.A.2. Analyse de la quantité des ARNm cibles détectés par RT étalonnée et PCR quantitative 101
IX.A.3. Quantification des protéines par ELISA ... 101
IX.A.4. Analyse des coupes traitées en immunohistochimie et révélées à la péroxydase ... 101
IX.A.4.a. Mesure de la densité de neurones de la densité de microglie ... 101
IX.A.4.b. Comptage de cellules rondes CD-11b positives ... 102
IX.A.5. Analyse des coupes utilisées pour le double immunomarquage fluorescent ... 102
IX.B. Expression des résultats ... 102
IX.C. Traitements statistiques des résultats ... 103

RESULTATS ET DISCUSSIONS ... 113

I. Caractérisation de la ré-organisation cellulaire associée à la mort des neurones après *status epilepticus* induit par la pilocarpine. ... 113
I.A. La sclérose de l'hippocampe après induction du status epilepticus par la pilocarpine. ... 113
I.A.1. Atrophie de l'hippocampe de rats à la fin de l'épileptogenèse ... 113
I.A.2. Estimation de la perte des neurones ... 113
I.A.3. Appréciation de la cicatrice gliale ... 114
I.A.4. Synthèse et éléments de discussion ... 119
I.B. Cinétique de mise en place de la dégénérescence neuronale et de la gliose réactionnelle dans l'hippocampe à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine ... 122
I.B.1. Cinétique de mise en place de la mort des neurones vulnérables de l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse ... 122
I.B.2. Cinétique de mise en place de la microgliose réactionnelle dans l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse ... 123
I.B.3. Cinétique de mise en place de l'astrocytose dans l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse ... 124

I.B.4. Synthèse et éléments de discussion 128
I.C. Mise en évidence de l'infiltration de monocytes dans le parenchyme de l'hippocampe à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine 130
I.C.1. Analyse morphologique des cellules CD11b-positives dans l'hippocampe à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine 130
I.C.2. Recherche de la présence de cellules CD14 positives dans l'hippocampe à la suite du *status epilepticus* induit par la pilocarpine 132
I.C.3. Expression des gènes des chimiokines dans l'hippocampe à la suite du *status epilepticus* induit par la pilocarpine 133
I.C.4. Synthèse et éléments de discussion 138

II. Induction de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, TNF-α et IL-6 dans l'hippocampe à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine 141
II.A. Les cytokines IL-1β et IL-1 Ra et le récepteur IL-1 de type I 141
II.B. Les cytokines TNF-α et IL-6 142
II.C. Synthèse et éléments de discussion 147

III. Effets des anti-inflammatoires sur la gliose réactionnelle et la mort des neurones observée dans l'hippocampe de rat à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine 150
III.A. Effets des anti-inflammatoires sur la récupération des rats à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine 151
III.B. Effets des anti-inflammatoires sur les modifications morphologiques de l'hippocampe 151
III.B.1. L'atrophie de l'hippocampe 152
III.B.2. La perte des neurones 152
III.B.3. La réactivité de la microglie 152
III.C. Effets de l'indométhacine sur la dynamique de la gliose réactionnelle et de la neurodégénérescence à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine 153
III.C.1. Effet sur la microgliose réactionnelle 153
III.C.2. Effet sur l'induction de l'IL-1β 153
III.C.3. Effet sur la dégénérescence neuronale et l'astrocytose 154
III.D. Synthèse et éléments de discussion 162
III.D.1. Effets délétères du traitement à la methylprednisolone 162
III.D.2. Efficacité limitée du traitement à l'indométhacine 162

IV. Etude du système héparanase et des chaînes de sulfate d'héparane dans l'hippocampe de rat à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine : Implication dans l'infiltration monocytaire ? 165
IV.A. Caractérisation de la synthese de l'héparanase dans le cerveau 165
IV.A.1. Production constitutive de l'héparanase dans différentes régions du cerveau 166
IV.A.2. Synthèse de l'héparanase dans le cerveau au cours du développement post-natal et du vieillissement 166
IV.A.3. Induction de la production de l'héparanase au cours de la neuritogenèse 168
IV.B. Expression et distribution de l'héparanase dans l'hippocampe à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine 168
IV.C. Détection des sites de liaison de l'héparanase sur les chaînes de sulfate d'héparane à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine. 170
IV.D. Synthèse et éléments de discussion 180
IV.D.1. Présence de l'héparanase dans les neurones du cerveau de rat 180
IV.D.2. Distribution de l'héparanase dans l'hippocampe à la suite du *status epilepticus* 181

CONCLUSION GÉNÉRALE 185

I. Phase aiguë de l'inflammation de l'hippocampe à la suite du *SE* 185

II. Phase « chronique » de l'inflammation de l'hippocampe à la suite du *SE* 186

PERSPECTIVES 189

I. Blocage de l'infiltration des cellules immunocompétentes « périphériques » 189

II. Modulation de la différenciation toxique des cellules infiltrantes 191

III. Inhibition de la réponse inflammatoire au cours du *SE*: bénéfices à long terme sur les capacités cognitives ? 191

GLOSSAIRE 192

PUBLICATIONS 196

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure RB1 : *Anatomie de l'hippocampe de rat* *19*
Figure RB2 : *Cyto-architecture de l'hippocampe de rat* *20*
Figure RB3 : *Etude bibliométrique sur les différents modes d'induction du SE* *21*
Figure RB4 : *Phénotype des cellules immunocompétentes* *46*
Figure RB5 : *Le système IL-1* *47*
Figure RB6 : *Interaction du système plasminogène/plasmine et des métalloprotéinases : exemple de la métalloprotéinase 9* *48*
Tableau RBI : *La famille des métalloprotéinases (MMPs) et leurs substrats préférentiels* *49*
Figure RB7 : *Organisation moléculaire d'un protéoglycane à sulfate d'héparane (HSPG)* *59*
Tableau RBII : *Caractéristiques biochimiques des glycosaminoglycanes (GAG)* *60*
Figure RB8 : *Diversité des squelettes protéiques portant les chaînes d'HS* *61*
Tableau RBIII : *Distribution tissulaire des syndécanes et des glypicanes. La liste des organes cités est non-exhaustive* *61*
Figure RB9 : *Schéma des étapes de biosynthèse des chaînes d'HS* *62*
Figure RB11 : *Implications des chaînes d'HS dans les étapes clés de la pénétration tissulaire de monocyte au travers de l'endothélium au niveau du site inflammatoire.* *63*
Figure RB12 : *Structure prédictive et schéma de maturation de l'héparanase humaine* *73*
Figure RB13 : *Trafic intracellulaire et localisation subcellulaire de l'héparanase* *74*
Figure RB14 : *Mécanismes proposés pour la traversée de la barrière endothéliale par la « voie » de l'héparanase* *75*
Figure MM1 : *Induction du status epilepticus par la pilocarpine* *104*
Figure MM4 : *Caractérisation de la réponse inflammatoire à la suite du status epilepticus* *105*
Figure MM5 : *Protocole de traitements anti-inflammatoires au cours de l'épileptogenèse après injection de pilocarpine. Procédure expérimentale : prélèvement des tissus frais* *106*
Figure MM6 : *Protocole de traitement par les anti-inflammatoires au cours de l'épileptogenèse après induction du SE par la pilocarpine. Procédure expérimentale : perfusion des tissus* *107*
Figure MM7 : *Procédure expérimentale de microdissection des structures cérébrales d'intérêt* *108*
Figure MM8 : *Détection des ARN messagers tissulaires à partir de la RT étalonnée suivie d'une PCR en temps réel* *109*
Tableau MMI : *Séquences des couples d'amorces nucléotidiques sens et anti-sens utilisés pour l'amplification des ADNc cibles par PCR en temps réel* *110*
Tableau MMII : *Conditions d'amplification des gènes d'intérêt par PCR en temps réel sur Light Cycler ™ (Roche®)* *111*
Tableau MMIII : *Liste des anticorps utilisés pour les détections immunohistochimiques* *112*
Figure R1 : *Mesure de l'atrophie de l'hippocampe dorsal après induction du SE par la pilocarpine* *116*
Figure R2 : *Estimation de la perte de neurones et appréciation de la réactivité des astrocytes dans l'hippocampe dorsal après induction du SE par injection de pilocarpine* *117*
Figure R3 : *Corrélation entre les dommages tissulaires et la réactivité de la microglie dans les cerveaux de rats ayant développés un SE 15 jours auparavant* *118*
Figure R4 : *Cinétique de mise en place de la neurodégénérescence et de la microgliose réactionnelle à la suite d'un status epilepticus induit par la pilocarpine* *125*
Figure R5 : *Cinétique de mise en place de l'astrocytose à la suite d'un status epilepticus induit par la pilocarpine* *127*
Figure R6: *Analyse morphologique des cellules CD11b positives à la suite d'un status epilepticus induit par la pilocarpine* *134*
Figure R7 : *Caractérisation « phénotypique » des cellules rondes CD11b-positives observées dans le hile 1 jour après SE induit par la pilocarpine* *136*
Figure R8 : *Taux des ARNm des chimiokines MCP-1, MIP-1a et MIP-1b dans l'hippocampe à la suite d'un status epilepticus induit par la pilocarpine* *137*

Figure R9 : *Taux des ARNm des protéines du système de l'IL-1 et répartition des protéines dans l'hippocampe à la suite d'un SE induit par la pilocarpine*..... *144*
Figure R10 : *Taux des ARNm des cytokines TNF-α et IL-6 et répartition des protéines dans l'hippocampe à la suite d'un SE induit par la pilocarpine* *146*
Figure R11 : *Effets des anti-inflammatoires sur la récupération des rats ayant développé un SE induit par la pilocarpine - Index de la masse corporelle* *155*
Figure R12 : *Effets des anti-inflammatoires sur l'atrophie de l'hippocampe observée 15 jours après SE induit par la pilocarpine*..... *156*
Figure R13 : *Effets des anti-inflammatoires sur la perte des neurones et la réactivité de la microglie dans l'hippocampe observée 15 jours après SE induit par la pilocarpine* *157*
Figure R14 : *Effets de l'indométhacine sur la microgliose réactionnelle et sur l'infiltration monocytaire dans le GD après SE induit par pilocarpine* *159*
Figure R15 : *Effets de l'indométhacine sur l'augmentation du taux de l'ARNm de l'IL-1b et sur la répartition de cette cytokine dans l'hippocampe après SE induit par la pilocarpine*..... *160*
Figure R16 : *Effets de l'indométhacine sur la neurodégénérescence et l'astrocytose après status epilepticus induit par pilocarpine*..... *161*
Figure R17 : *Distribution de l'héparanase dans différentes régions du cerveau de rat adulte*..... *172*
Figure R18 : *Mise en évidence de la présence de l'héparanase dans le cerveau de rat*..... *173*
Figure R19 : *Taux d'ARNm de l'héparanase dans l'hippocampe, le néocortex et le bulbe olfactif au cours du développement postnatal et du vieillissement.*..... *174*
Figure R20 : *Quantité de protéines et distribution de l'héparanase dans le cerveau de rat au cours du développement postnatal et du vieillissement*..... *175*
Figure R21 : *L'apparition de l'héparanase est corrélée à la neuritogenèse au cours de la différenciation induite par le NGF des cellules PC12* *176*
Figure R22 : *Quantité et distribution de l'héparanase dans l'hippocampe à la suite d'un SE induit par la pilocarpine*..... *177*
Figure R23 : *Distribution des sites de liaison de l'héparanase dans l'hippocampe à la suite d'un status epilepticus induit par la pilocarpine* *179*
Figure C1 : *Conclusion générale*..... *188*

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le cerveau est un système intégrateur nous permettant d'interagir de façon adaptée avec notre environnement. Le maintien de l'intégrité des réseaux neuronaux est essentiel au bon fonctionnement cérébral. Toutefois, cette intégrité est souvent mise en péril, comme ceci est le cas à la suite d'un traumatisme crânien ou encore d'une ischémie cérébrale. Ces accidents provoquent au sein du cerveau des lésions de grande amplitude. Lorsque le tissu périphérique est lésé, une réaction inflammatoire se met en place pour amorcer la régénérescence tissulaire et repose, notamment, sur le recrutement de leucocytes circulants. Toutefois, le cerveau semble être un organe « immuno-spécialisé » et la mise en place de la réaction inflammatoire dans les tissus qui entrent dans sa composition présente des caractéristiques particulières. En effet, les tissus cérébraux sont isolés du compartiment vasculaire par une structure complexe, la barrière hémato-encéphalique qui ne permet que des échanges limités entre le sang et le parenchyme cérébral. En outre, d'un point de vue anatomique, le cerveau est dépourvu de drainage lymphatique, ce qui limite considérablement les voies d'accès des cellules de l'immunité au parenchyme cérébral. Enfin, le cerveau contient un important contingent de cellules immunocompétentes résidentes, que l'on appelle les cellules microgliales. Une réaction inflammatoire se déclenche localement au niveau des tissus cérébraux à la suite de lésions provoquées par un traumatisme crânien, une ischémie cérébrale ou au cours du développement pathologique de la maladie d'Alhzeimer. De nombreuses études indiquent que cette inflammation cérébrale, caractérisée par une production locale de cytokines pro-inflammatoires, exacerbe considérablement les dommages tissulaires en provoquant la mort des neurones. Par ailleurs, il apparaît de plus en plus clair que, dans certaines situations, l'inflammation qui se développe au niveau central est renforcée par un recrutement de leucocytes dans le parenchyme cérébral.

Le développement des épilepsies partielles du lobe temporal (EPLT) est associé à de profonds remaniements structuraux qui affectent l'hippocampe, une structure cérébrale du système limbique impliquée dans les processus de mémorisation. Parmi ces remaniements, on distingue la mort de certaines populations de neurones et une gliose réactionnelle. Les neurones les plus vulnérables seraient ceux qui sont impliqués dans une boucle de rétrocontrôle négatif du niveau d'excitabilité des neurones principaux. Leur dégénérescence entraînerait une levée d'inhibition et la mise en place de réseaux neuronaux hyperexcitables. Une stimulation modérée des voies afférentes au niveau de l'hippocampe provoquerait alors la décharge synchrone de nombreux neurones, ce qui expliquerait ainsi la récurrence des

crises. Il existe des modèles expérimentaux d'EPLT pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la mort des neurones au cours de la période de transformation du tissu hippocampique sain en tissu épileptique. Les modèles expérimentaux des EPLT reposent sur l'induction chez les rongeurs d'un *status epilepticus* (*SE*) qui provoque, après une phase silencieuse (correspondant à l'épileptogenèse), l'apparition de crises récurrentes. Dans ces modèles, des études précédentes nous renseignent sur la survenue d'une réaction inflammatoire dans l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse, caractérisée par l'activation des cellules microgliales et la production de cytokines pro-inflammatoires. Il se pourrait alors que le déclenchement de cette réaction inflammatoire à la suite des premières lésions excito-toxiques contribue à la mort des neurones. Néanmoins, les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation cérébrale sont encore mal caractérisés au cours de l'épileptogenèse, et les rôles joués par cette dernière dans la transformation épileptique de l'hippocampe restent à établir clairement. En particulier, la démonstration du phénomène d'infiltration de monocytes/macrophages à la suite du *SE* mérite de plus amples investigations. En effet, au regard des outils actuellement disponibles, il est très difficile de discriminer les cellules microgliales résidentes des monocytes circulants, et les auteurs qui concluent hâtivement à une infiltration de monocytes/macrophages ne se basent que sur la morphologie dite amiboïde des cellules détectées. Toutefois, cette morphologie pourrait également correspondre à un état d'activation transitoire des cellules microgliales résidentes.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient donc :

- ✓ de caractériser la réponse inflammatoire de l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine
- ✓ de mettre en évidence au travers d'approches multiples le phénomène d'infiltration de monocytes/macrophages dans l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine et de le quantifier
- ✓ de déterminer les effets de certains anti-inflammatoires sur l'inflammation cérébrale et sur les réorganisations structurales de l'hippocampe à la suite d'un SE induit par la pilocarpine.
- ✓ Enfin, nous avons exploré une piste originale qui pourrait nous conduire au mécanisme de l'infiltration de cellules immunocompétentes dans l'hippocampe : il s'agit de l'étude de l'expression du gène de l'héparanase. Cette enzyme dégrade les chaînes de sulfate d'héparane qui sont très représentées dans les membranes basales entourant les vaisseaux sanguins et dans la matrice extracellulaire de l'hippocampe. Il a été précédemment montré que le pouvoir invasif des cellules métastatiques ou des leucocytes circulants était considérablement augmenté lorsque ceux-ci

contiennent l'héparanase à leur surface [82,93]. Bien que la présence de l'héparanase ait été longtemps restreinte aux tissus immuns dans les conditions physiologiques, d'autres lieux de synthèse ont été révélés ces dernières années. Toutefois, aucune étude ne porte sur la synthèse constitutive de l'héparanase dans le cerveau de rat. Dans ce contexte, nous avons tout d'abord cherché à décrire chez le rat i) les lieux de synthèse constitutive de l'héparanase et sa distribution dans le cerveau dans les conditions physiologiques, ii) la régulation du gène de l'héparanase dans des situations de forte plasticité structurale telles que le développement post-natal, iii) la régulation de l'expression de cette enzyme au cours de la différenciation neuronale induite par le NGF des cellules PC12 en culture. Puis, nous avons caractérisé l'expression et la distribution de cette enzyme dans l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse.

HISTORIQUE SCIENTIFIQUE

I. Les épilepsies du lobe temporal et l'épileptogenèse

I.A. LES EPILEPSIES DU LOBE TEMPORAL

I.A.1. Généralités

L'épilepsie est le second trouble neurologique le plus répandu en France après la migraine, et se caractérise par la répétition de crises soudaines et brèves. Ces crises sont la manifestation clinique de l'hyperexcitabilité du cerveau et de l'hypersynchronie de certains groupes de neurones. L'incidence des premières crises est établie aux environs de 70 cas pour 100 000 habitants, et dans 30 à 65 % des cas, ces crises récidiveront. C'est la récurrence de ces crises qui définit l'épilepsie. L'incidence des épilepsies est évaluée dans les pays développés entre 45 et 50 cas pour 100 000 habitants, et est plus importante chez les enfants et chez les personnes âgées [63]. La prévalence de ce trouble neurologique s'établit entre 6 et 10 cas pour 1000 habitants, ce qui porte l'estimation à environ 400 000 ou 500 000 épileptiques en France. Le taux de mortalité des patients épileptiques est relativement élevé, le risque de mort subite d'un patient épileptique étant 24 fois supérieur à celui d'un individu sain. La complexité des épilepsies rend leur diagnostic difficile. En effet, la forme d'expression des crises est multiple et dépend de la zone cérébrale où prend naissance l'hyperexcitabilité. Cette zone cérébrale initiale est appelée foyer épileptogène. (Source: http://www.fondation-epilepsie.fr; National Institute of Neurological Disorders and Stroke, http://www.ninds.nih.gov).

L'étiologie des épilepsies est multi-factorielle. Par exemple, par leurs caractères topographiques ou histologiques, certaines lésions cérébrales acquises paraissent suffisantes pour provoquer une épilepsie. Mais à lésion égale, seuls les indvidus ayant une prédisposition génétique présenteront des crises et les risques de récidive seront trois fois plus importants chez les enfants dont les parents sont épileptiques. Néanmois, malgré la nature très hétérogène des épilepsies, il a été proposé une classification qui en distingue trois catégories : les épilepsies idiopathiques, les épilepsies symptomatiques et les épilepsies présumées symptomatiques ou dites cryptogénes [219]. Les épilepsies idiopathiques ont pour origine un facteur génétique et incluent les canalopathies. Les épilepsies symptomatiques résultent d'une lésion cérébrale acquise qui provoque les crises. Les épilepsies cryptogénes sont caractérisées par le fait qu'aucune lésion du cerveau n'est identifiable à l'examen clinique. Il s'agit pour la

plupart d'épilepsies symptomatiques dont la lésion, qui peut être évolutive, n'est pas encore détéctée par les méthodes d'investigations actuellement disponibles. Cette classification est en constante évolution.

Les épilepsies qui se déclenchent à l'âge adulte sont généralement de type symptomatique. Les agressions cérébrales épileptogènes les plus communément retrouvées à l'âge adulte sont les traumatismes crâniens, les accidents vasculaires cérébraux ou encore les tumeurs cérébrales (Source : http://www.fondation-epilepsie.fr). Les épilepsies partielles du lobe temporal (EPLT) constituent la forme d'épilepsie la plus diagnostiquée chez le sujet adulte [269]. Dans ces épilepsies, la décharge synchrone est amorcée dans une zone du cerveau localisée dans le lobe temporal et peut, secondairement, se propager. A la suite d'une agression du cerveau, et avant le déclenchement des crises récurrentes définissant le syndrome épileptique, on observe une période de latence sans crise, appelée épileptogenèse, qui peut durer plusieurs années. Plusieurs modèles animaux ont donc été dévéloppés dans le but de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires associés à l'épileptogenèse (voir paragraphe I.B. de l'historique scientifique). En effet, les EPLT sont souvent pharmacorésistantes, ce qui signifie que les médicaments actuellement disponibles ne permettent pas d'enrayer la récurrence des crises. Pour ces patients, et quand les conditions sont remplies (foyer épileptogène situé dans l'aire corticale d'étendue limitée et aux contours bien définis), le traitement par voie chirurgicale demeure le seul recours. En France, on estime à 12 000 le nombre de candidats potentiellement opérables pour moins d'une centaine de cas opérés chaque année. Bien qu'efficace dans 70% des cas, l'exérèse chirurgicale du foyer épileptogène est une intervention lourde qui peut provoquer des séquelles invalidantes. Par ailleurs, les médicaments actuellement prescrits, même lorsqu'ils sont efficaces, atténuent les symptômes des épilepsies, mais ne permettent pas leur rémission [63]. De nouvelles voies thérapeutiques sont donc à inventer. En particulier, la compréhension des mécanismes associés à la transformation d'un cerveau sain en cerveau épileptique aboutirait à l'élaboration de nouveaux traitements visant à prévenir cet épileptogenèse chez des individus prédisposés ou à haut risque [219].

I.A.2. Les observations anatomiques chez l'homme

I.A.2.a. L'apport de l'imagerie médicale

La principale modification morphologique identifiée par imagerie médicale associée aux épilepsies partielles du lobe temporal (EPLT) serait la sclérose de l'hippocampe [68]. Cette sclérose est caractérisée par une atrophie unilatérale de la formation hippocampique détectable par les techniques d'imagerie actuellement disponibles. Par ailleurs, le suivi d'une

grande cohorte de patients épileptiques révèle que la sclérose hippocampique est majoritairement diagnostiquée chez des patients présentant une épilepsie partielle du lobe temporal pharmacorésistante [258]. Ainsi, l'hippocampe serait une structure clé dans la mise en place des épilepsies du lobe temporal. Ceci est conforté par le fait que l'enregistrement électrique du cerveau du patient atteint d'EPLT grâce à des électrodes profondément implantées révèle une activité hypersynchrone dans l'hippocampe. De plus, la résection chirurgicale de l'hippocampe chez ces patients réduit considérablement la fréquence des crises [269]. Comprendre les mécanismes qui déterminent la mise en place de cette sclérose de l'hippocampe est un des enjeux les plus importants dans le domaine de la recherche sur les EPLT pharmacorésistantes.

I.A.2.b. Anatomie de l'hippocampe

Chez les mammifères supérieurs, l'hippocampe est une structure cérébrale sous-corticale (***Figure RB1***), qui occupe la face interne du lobe temporal. Il appartient avec l'amygdale, le septum et le thalamus au système limbique, qui joue un rôle essentiel dans les processus de mémorisation et le contrôle des émotions.

i. STRUCTURE TISSULAIRE

L'hippocampe est constitué de deux feuillets neuronaux interconnectés : le gyrus denté (GD) et la corne d'Ammon (CA), elle-même subdivisée sur la base de critères morphologiques en trois régions, CA1, CA2, CA3 (***Figure RB1***). La principale voie afférente de l'hippocampe est la voie perforante, qui regroupe notamment les axones des neurones du cortex entorhinal, mais également de l'hippocampe controlatéral, du septum et de certains noyaux du tronc cérébral (locus coeruleus, raphé). En particulier, les afférences commissurales (reliant les deux hippocampes droit et gauche) s'établissent grâce à un réseau de fibres, appelé la fimbria. La principale voie efférente est le fornix qui conduit les axones des neurones de l'hippocampe vers le septum, le noyau accumbens, le cortex frontal médian et les corps mamillaires. Les neurones de l'hippocampe se projettent également sur le cortex entorhinal, constituant ainsi une boucle anatomique [6].

Au sein de l'hippocampe, le flux d'information est unidirectionnel. Par exemple, les neurones du cortex entorhinal contactent majoritairement les neurones du GD (appelés cellules granulaires) et les neurones de CA3 (les principaux neurones de la CA sont appelés les cellules pyramidales). Les axones des neurones granulaires, appelés fibres moussues, se projettent à travers le hile sur les dendrites des cellules pyramidales de CA3, qui, à leur tour, projettent des collatérales d'axones (appelées collatérales de Schaeffer) vers les neurones pyramidaux de CA1. Ces derniers contactent les neurones du *subiculum*, qui est connecté au

cortex entorhinal. Le GD se décline en trois couches : la couche granulaire (*stratum granulosum*) qui contient les corps cellulaires des neurones granulaires, la couche moléculaire, formée par les dendrites apicales des cellules granulaires et leurs afférences et enfin, la couche polymorphe, formée des segments initiaux des axones des neurones granulaires (***Figure RB1***). La CA est composée de la couche pyramidale (*stratum pyramidalis*) contenant les corps cellulaires des neurones pyramidaux, les *stratum radiatum* et *stratum lacunosum/ moleculare* (*SLMo*) qui contiennent respectivement les segments proximaux et distaux de l'arbre dendritique apical, et enfin le *stratum oriens* qui contient les dendrites basales des cellules pyramidales (***Figure RB1***). Au niveau de CA3, il est décrit une couche supplémentaire entre les *stratum pyramidalis et stratum radiatum*, appelée *stratum lucidum*, qui contient les segments les plus proximaux des dendrites des neurones pyramidaux contactés par les fibres moussues. Par ailleurs, dans le hile (extrémité de CA3) se situent des neurones excitateurs qui incluent les cellules moussues glutamatergique. Ces dernières envoient non seulement des axones localement mais aussi vers les dendrites de la couche moléculaire du GD.

ii. STRUCTURE CELLULAIRE

Les cellules principales du GD sont les neurones granulaires dont les corps cellulaires sont petits (8-12 µm) et compacts. Les dendrites apicales de ces neurones émettent de nombreuses ramifications fines qui peuvent parfois atteindre la fissure hippocampique. Ces neurones ne possèdent pas de dendrite basale. Les axones des neurones granulaires se rassemblent pour former les fibres moussues, qui contactent les dendrites apicales des cellules pyramidales de CA3 en formant un bouton synaptique géant caractéristique. Dans le hile, les axones donnent naissance à de nombreuses collatérales qui contactent les cellules principales du hile, les cellules moussues. Les neurones granulaires sont glutamatergiques; le glutamate étant le neurotransmetteur excitateur le plus répandu au sein du SNC. Une des particularités de l'hippocampe est que son contingent de cellules granulaires soutient un renouvellement lent et permanent, qui persiste à l'âge adulte [84]. Ceci est rendu possible par la présence de cellules souches neurales localisées dans la zone sous-granulaire.

Les neurones pyramidaux glutamatergiques sont les cellules principales de la CA. Ces cellules peuvent avoir un diamètre variable; les corps cellulaires des neurones pyramidaux de CA3 étant plus volumineux que ceux de CA1. Généralement, leurs dendrites apicales sont orientées radialement à travers du *stratum radiatum* pour venir se terminer, sous forme de fines branches dans le *SLMo*.

Dans le hile, on trouve principalement une population de neurones glutamatergiques, appelés les cellules moussues, qui émettent des projections de type ipsilatéral et commissural

dans le GD [80]. Elles se distinguent par une arborisation dendritique très dense contenant de nombreuses épines, confinée dans le hile [5]. Les axones des cellules moussues innervent les neurones granulaires et des interneurones localisés dans le hile. L'hippocampe contient environ 10% d'interneurones qui sont généralement de type GABAergiques (GABA pour *gamma-aminobutiric acid*), et qui viennent exercer un rétrocontrôle négatif du niveau d'excitabilité des neurones principaux (neurones granulaires). Ces interneurones constituent une population cellulaire hétérogène et peuvent être localisés dans différentes régions de l'hippocampe (le hile, la couche granulaire du GD, *stratum oriens*). Une des boucles de rétrocontrôle négatif de l'excitabilité des neurones granulaires impliquerait les cellules moussues, et des interneurones inhibiteurs du hile et/ou de la couche granulaire (***Figure RB2***).

I.A.2.c. Caractérisation de la sclérose de l'hippocampe chez l'homme

Le traitement chirurgical des EPLT, ainsi que les prélévements *post-mortem*, permettent de recueillir des pièces réséquées de tissu épileptogène et offrent la possibilité d'étudier chez l'homme les modifications tissulaires associées à la mise en place des épilepsies [68]. Néanmoins, de nombreuses précautions doivent être prises dans l'interprétation des données ainsi récoltées. En effet, les tissus collectés ne sont pas représentatifs de l'ensemble des patients épileptiques et concernent uniquement soit les patients opérables atteints d'EPLT pharmacorésistants, soit 1 patient sur 1000 pour les prélévements *post-mortem*. Ces patients présentent des syndromes épileptiques parfois très différents (nombre de crises, nature des crises, durée des crises…) et des traitements médicamenteux, avant l'opération, très rarement similaires. Par ailleurs, il est difficile de dissocier dans ces tissus les lésions provoquées par les crises et/ou la mise en place de l'épilepsie de celles imputables à l'agression cérébrale initiale. Enfin, la faible disponibilité des tissus issus d'individus sains ou non-épileptiques constitue un obstacle supplémentaire à l'analyse des pièces réséquées [163].

Néanmoins, l'analyse des pièces réséquées de tissu épileptogène a révélé que la sclérose de l'hippocampe était caractérisée par une perte importante de neurones et une ré-organisation structurale au sein de l'hippocampe [68,227]. La perte de neurones affecte plus particulièrement certaines populations spécifiques telles que les interneurones du hile et les cellules pyramidales de la région CA1 et de la région CA3 alors que les neurones du GD et du *subiculum* sont plutôt préservés [48,51,227,284]. Une dispersion des cellules en grain est également observée [269]. L'implication de cette perte de neurones dans l'installation de circuits favorables à l'hyperexcitabilité et/ou à la génération de crises n'est en revanche pas clairement établie [269]. L'hypothèse la plus communément admise est que la perte

d'interneurones du hile contribue à la mise en place de réseaux neuronaux hyperexcitables. L'identité des interneurones du hile qui ont dégénéré est difficile à établir clairement compte tenu de l'hétérogénéité de cette population cellulaire. Il existe néanmoins une hypohèse alternative à celle de la dégénérescence des interneurones GABAergiques ; celle de leur mise en sommeil à la suite de la dégénérescence massive des cellules moussues [27,269,270]. Ces cellules reçoivent normalement de nombreux contacts synaptiques en provenance des cellules granulaires. La perte de ces cibles entraînerait une ré-organisation des connections synaptiques des cellules granulaires [10]. L'analyse comparative des hippocampes des patients présentant une EPLT avec sclérose de cette structure et des sujets témoins sans épilepsie, révèle en effet que, dans le premier groupe, la densité des fibres moussues est très élevée dans la couche moléculaire externe, c'est-à-dire la zone qui contient les dendrites apicales des neurones granulaires [227]. Il a donc été proposé que la perte des cellules moussues provoquerait un bourgeonnement des fibres moussues et la formation de nouvelles synapses aberrantes, ce qui créerait ainsi des circuits neuronaux hyperexcitables [269]. Des enregistrements électrophysiologiques réalisés sur des coupes d'hippocampes provenant de groupes de patients épileptiques avec ou sans sclérose confortent cette hypothèse, puisqu'ils révèlent que le niveau d'excitabilité des neurones granulaires du premier groupe est supérieur à celui du second groupe [52].

La cicatrice gliale est également une autre caractéristique de l'hippocampe sclérosé chez le patient épileptique. Les astrocytes sont des cellules du système nerveux central (SNC) à la forme étoilée, qui contactent aussi bien les vaisseaux sanguins que les neurones, et qui ont d'abord été décrits pour leur rôle de soutien structural dans le cerveau. Par la suite, il a été établi que ces cellules gliales assuraient des fonctions beaucoup plus complexes, essentielles au maintien de l'homéostasie cérébrale. Les astrocytes constituent la population cellulaire la plus représentée dans l'hippocampe sclérosé des patients épileptiques [51], où ils sont particulièrement abondants dans les zones les plus affectées par la perte des neurones [48]. Ces astrocytes sont différents de ceux des tissus sains et dans la mesure où ils présentent une hypertrophie de leur corps cellulaire, on parle alors d'astrocytes réactifs. Ces astrocytes synthétisent des facteurs neurotrophes favorisant la pousse axonale en culture, ce qui a conduit à émettre l'hypothèse que les astrocytes réactifs localisés au niveau des zones de lésion contribueraient à la mise en place de réseaux neuronaux hyperexcitables [48,52]. Par ailleurs, ces astrocytes présenteraient une moindre capacité de capture du glutamate extracellulaire et de transformation de ce glutamate en glutamine [52], ce qui concourrait à l'augmentation du taux de glutamate extracellulaire mesurée par microdialyse dans l'hippocampe sclérosé de patient épileptique [52].

La densité d'une autre catégorie de cellules, les cellules microgliales (voir paragraphe II.A.1. de l'historique scientifique), est également augmentée considérablement dans les zones les plus lésées de l'hippocampe sclérosé [16], mais ceci est encore mal caractérisé dans l'hippocampe issu de patients atteints d'ELT.

Les études sur les pièces réséquées de patients épileptiques ont conduit à considérer la sclérose de l'hippocampe et, en particulier, la mort de certaines populations de neurones vulnérables comme un mécanisme prépondérant dans l'installation de la récurrence des crises. Il est difficile chez l'homme de déterminer les origines de la sclérose de l'hippocampe ou les facteurs provoquant la mort des neurones. Le développement de modèles animaux pertinents est nécessaire afin d'appréhender au mieux le caractère dynamique des processus qui conduisent à la mort neuronale associée à l'épileptogenèse.

I.B. LES MODELES ANIMAUX DE LA NEURODEGENERESCENCE SELECTIVE DE L'HIPPOCAMPE ASSOCIEE A L'EPILEPTOGENESE

Les patients avec une ELT associée à une sclérose de l'hippocampe présentent souvent un historique de convulsions fébriles prolongées ou une autre forme d'agression cérébrale telle qu'un traumatisme crânien ou une infection intracérébrale dans les 4 ou 5 premières années de leur vie [68]. L'épileptogenèse des animaux, principalement chez les rongeurs qui servent de modèles, est généralement provoquée par un *status epilepticus (SE)* induit pharmacologiquement ou électriquement (***Figure RB3***). Le *SE* correspond à un état de mal convulsif avec de nombreuses crises répétées dans un intervalle de temps bref. Après le *SE*, on observe chez ces rongeurs une période de latence plus ou moins longue qui correspond à l'épileptogenèse et qui aboutit à l'apparition de crises récurrentes et spontanées. Le *SE* est appelé phase aiguë, la période de latence est appelée phase silencieuse en référence à l'absence de crises, et la période où les animaux développent des crises récurrentes est appelée phase chronique.

I.B.1. Induction du *SE* par voie pharmacologique

Parmi les agents pharmacologiques connus pour déclencher le *SE*, l'acide kaïnique et la pilocarpine sont les plus utilisés. L'acide kaïnique est un agoniste du glutamate spécifique des récepteurs ionotropes de type kaïnate, tandis que la pilocarpine est un agoniste d'un autre neurotransmetteur, l'acétylcholine, spécifique des récepteurs muscariniques.

Le modèle qui utilise l'acide kaïnique a été développé en 1979. Depuis sa première description où il était injecté dans l'amygdale, d'autres modes d'administration ont été

développés pour provoquer un *SE* (voie intrapéritonéale (i.p.), sous-cutanée, intracérébroventriculaire ou encore intra-hippocampique). Dans la phase chronique, l'hippocampe est lésé et présente une densité réduite de neurones dans CA3 et dans le hile, associée à une réactivité des astrocytes. Malgré certaines disparités (CA3 semble plus affecté par la perte des neurones que CA1 ; d'autres aires cérébrales sont lésées), ces lésions de l'hippocampe rappellent bien celles observées lors de l'analyse des pièces opératoires provenant de patients épileptiques. En outre, dans le modèle qui utilise l'acide kaïnique (injection dans l'hippocampe), une dispersion des cellules en grain est osbervée, ainsi qu'un bourgeonnement des fibres moussues de la couche moléculaire [220].

Le modèle qui utilise la pilocarpine a été développé en 1983; la pilocarpine est injectée en i.p. et le *SE* est arrêté après 2 ou 3 heures par administration de benzodiazépine (diazepam). Les animaux ainsi traités présentent des crises épileptiques récurrentes et spontanéees (phase chronique) environ 14 jours après le *SE*. La caractérisation des dommages dans le cerveau indique qu'une perte massive des neurones affecte différentes aires cérébrales (cortex entorhinal, amygdale, thalamus etc…). Dans l'hippocampe, les neurones les plus vulnérables seraient les cellules moussues du hile [181,271]. Dans la phase chronique, l'hippocampe des rats ayant développé un *SE* présente également le bourgeonnement caractéristique des fibres moussues. En revanche, la cicatrice gliale a reçu moins d'attention pour les animaux ainsi traités que pour ceux traités à l'acide kaïnique [220].

I.B.2. Induction du *SE* par voie électrique

L'induction expérimentale du *SE* par voie électrique résulte des observations de déclenchement de ce *SE* à la suite de la stimulation électrique continue des structures limbiques. Plusieurs types d'inductions existent en fonction de la structure limbique stimulée (amygdale, cortex piriforme, hippocampe). Par exemple, la stimulation à haute fréquence de l'hippocampe ventral pendant 1 heure est efficace pour induire un *SE* pour de nombreux rats. Par la suite, il a été mis en évidence qu'un *SE* peut être induit par des stimulations intermittentes de n'importe quelle voie excitatrice. Le protocole le plus répandu est la stimulation de la voie perforante. En particulier, le Pr. Sloviter a développé un modèle pertinent de stimulation électrique de la voie perforante où les lésions sont circonscrites à l'hippocampe [269].

Les principaux remaniements structuraux caractéristiques de l'hippocampe des patients épileptiques sont retrouvés dans les cerveaux d'animaux pour lesquels le *SE* a été obtenus par stimulations électriques, avec une perte neuronale qui affecte les cellules du hile, de CA1 et de CA3, associée à un bourgeonnement des fibres moussues.

Les animaux de laboratoire traités pour qu'ils développent un *SE* offrent une possibilité remarquable d'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'épileptogenèse. En particulier, ils permettent d'analyser dans l'hippocampe le décours temporel de la perte des neurones, et d'en rechercher les causes. L'une des causes possibles de la neurodégénérescence sélective observée dans l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse est la survenue d'une forte réaction inflammatoire cérébrale. L'inflammation au sein du cerveau est un ensemble de processus singuliers. En effet, le SNC a longtemps été considéré comme un site « immuno-privilégié » qui échapperait à la surveillance du système immunitaire. En effet, à l'état basal, les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 sont très faiblement représentées dans le cerveau, ce qui expliquerait la survie de longue durée des allogreffes qui y sont implantées. Néanmoins, ce privilège immunitaire est loin d'être absolu, puisqu'il est à présent bien établi que le SNC peut être le siège d'une réaction immunitaire, notamment caractérisée par une production locale de facteurs pro-inflammatoires. Les mécanismes cellulaires de cette « neuro-inflammation » seraient mis en jeu par une coopération entre des cellules immunocompétentes qui ont gagné le parenchyme cérébral et des cellules résidentes comme les astrocytes ou les cellules microgliales. Une réponse immunitaire incontrôlée peut provoquer le développement de maladies auto-immunes affectant le SNC comme la sclérose en plaques [37]. Par ailleurs, l'activation des voies de l'inflammation cérébrale se produit non seulement dans un contexte infectieux du SNC, mais également dans de nombreuses pathologies non-infectieuses du SNC. Ainsi, depuis seulement quelques années, les rôles neurotoxiques et/ou neuroprotecteurs de la réaction immunitaire non-infectieuse dans le SNC sont intensivement étudiés et sont encore aujourd'hui sujets à de nombreuses controverses. Notamment, de multiples efforts ont été engagés dans le domaine de la neurobiologie pour comprendre les mécanismes d'entrée des cellules inflammatoires dans le SNC et tenter d'identifier les facteurs permettant d'ajuster et de maîtriser l'inflammation du cerveau.

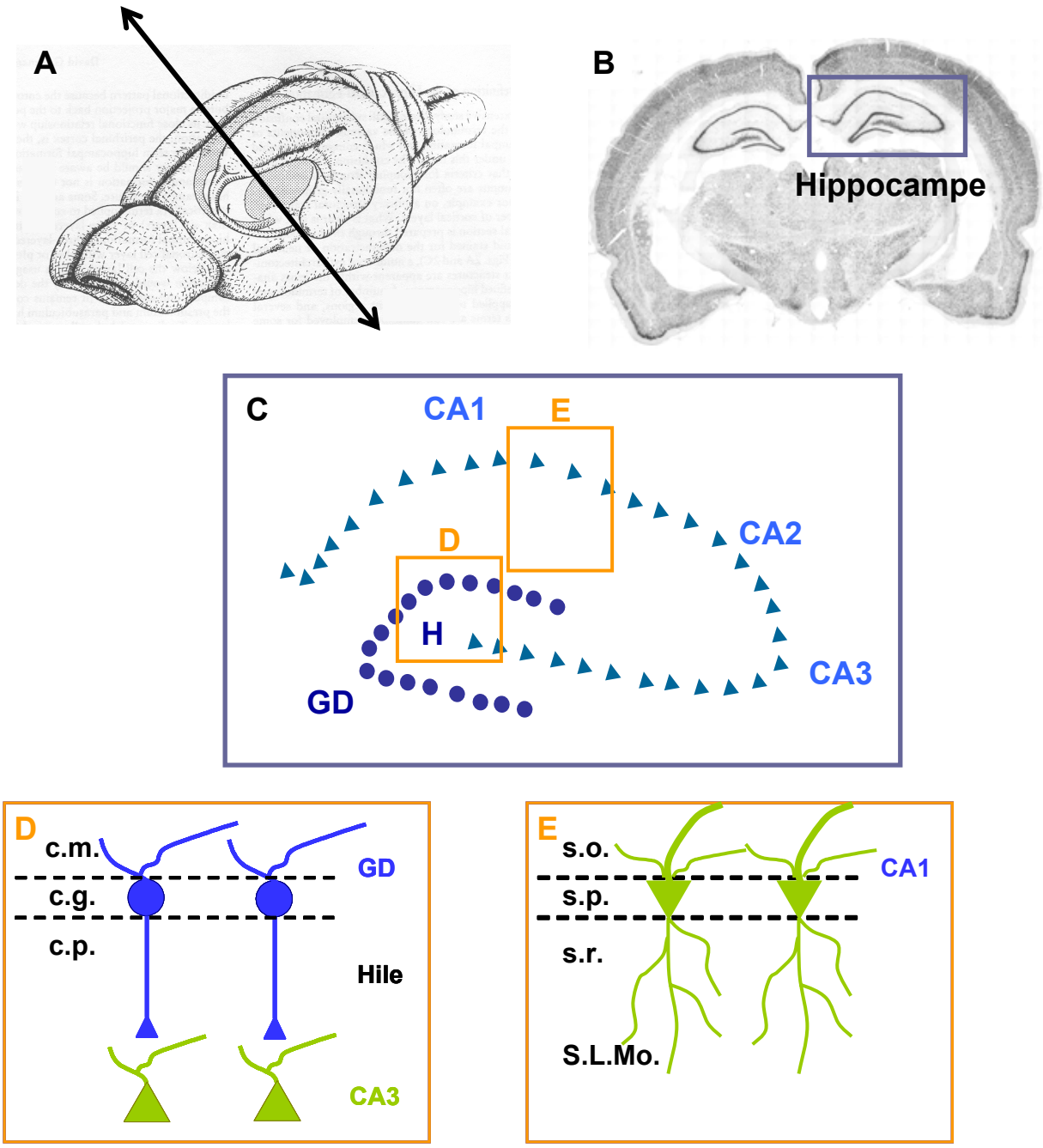


Figure RB1 : Anatomie de l'hippocampe de rat.

Localisation de l'hippocampe dans le cerveau de rat (**A**). Coupe coronale réalisée dans la partie antérieure de l'hippocampe, comme indiqué en (**A**) et colorée au crésyl violet (**B**). L'hippocampe se compose de 2 couches neuronales distinctes appelées la corne d'Ammon (CA), qui est subdivisée en 3 régions CA1, CA2 et CA3, et le gyrus denté (GD) (**C**). Au niveau du GD, on peut distinguer plusieurs couches : la couche moléculaire (c.m.), qui contient les dendrites apicales des neurones granulaires, la couche granulaire qui contient les corps cellulaires des neurones granulaires (c.g.) et enfin, la couche polymorphique, formée des segments initiaux des axones des neurones granulaires (les fibres moussues) qui traversent le hile pour contacter les dendrites des neurones pyramidaux de CA3 (**D**). Au niveau de CA1, on peut également distinguer plusieurs couches: *stratum oriens* (s.o.) qui contient les dendrites basales des neurones de CA1, *stratum pyramidale* (s.p.) qui contient les corps cellulaires des neurones pyramidaux, *stratum radiatum* (s.r.) et *stratum lacunosum moleculare* (S.L.Mo) qui contiennent respectivement les segments proximaux et distaux de l'arbre dendritique apical (**E**).

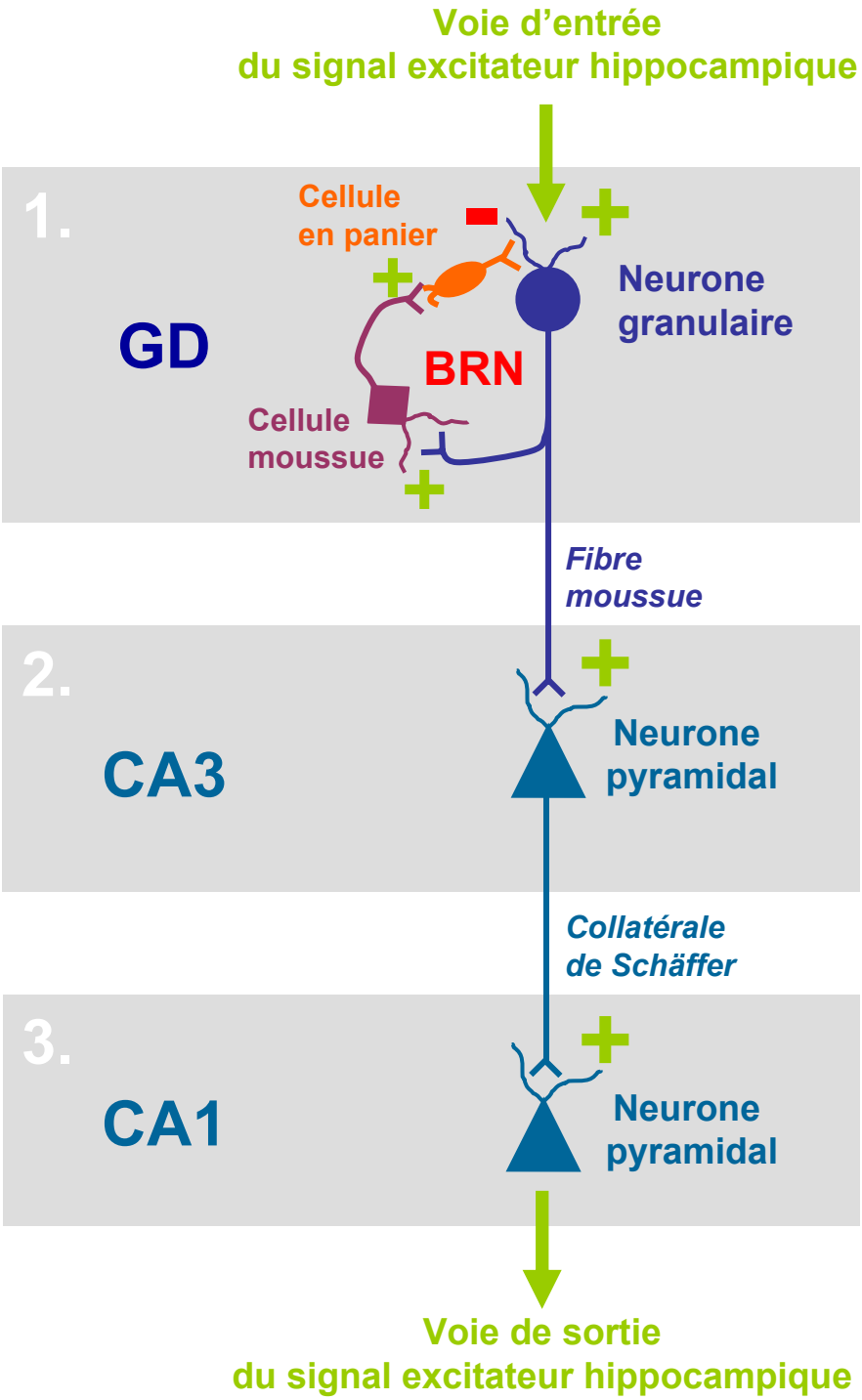


Figure RB2 : Cyto-architecture de l'hippocampe de rat.

Les neurones granulaires sont contactés par les neurones des territoires qui innervent l'hippocampe (cortex entorhinal, septum, locus coeruleus, raphé…). Lorsque ils sont excités, les neurones granulaires glutamatergiques transmettent un signal excitateur aux neurones pyramidaux de CA3, qu'ils contactent par l'intermédiaire de leurs axones, appelés les fibres moussues. Les neurones pyramidaux de CA3, également glutamatergiques, propagent le signal excitateur jusqu'aux neurones de CA1, qu'ils contactent par l'intermédiaire de collatérales d'axones, appelés les collatérales de Schäffer. Les neurones pyramidaux de CA1 contactent de nombreuses cibles comme les neurones du cortex entorhinal ou les neurones du *subiculum*. Pour les neurones granulaires, il existe par ailleurs une boucle de rétrocontrôle négatif (BRN) qui impliquent les cellules moussues glutamatergiques du hile, innervées par les neurones granulaires, et les interneurones GABAergiques, tels que les cellules en panier, innervées par les cellules moussues. Ces interneurones GABEergiques contactent les dendrites des neurones granulaires, et permettent de modérer le niveau de leur excitabilité.

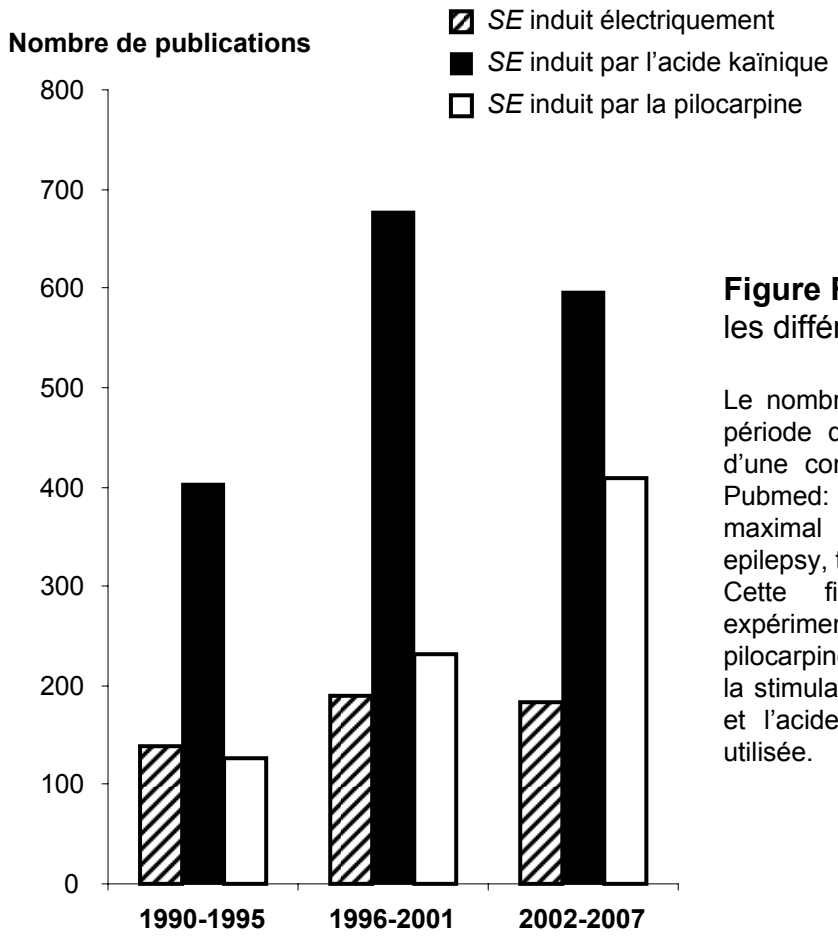


Figure RB3 : Etude bibliométrique sur les différents modes d'induction du SE

Le nombre de publications est reparti sur trois période de 5 ans, et résulte de la recherche d'une combinaison des mots clés suivant sur Pubmed: acid kaïnic, kaïnate, pilocarpine, maximal electroshock, status epilepticus, epilepsy, temporal lobe epilepsy.
Cette figure indique que pour induire expérimentalement le *status epilepticus* la pilocarpine est de plus en plus utilisée, alors que la stimulation électrique reste assez peu utilisée et l'acide kaïnique a tendance à être moins utilisée.

II. La neuro-inflammation : mécanisme déclencheur de l'épileptogenèse ?

Le SNC est composé de deux grands types cellulaires, les cellules nerveuses et les cellules gliales. Ces dernières sont divisées en deux catégories, la macroglie et la microglie. La macroglie regroupe les astrocytes et les oligodendrocytes. La microglie est une catégorie de cellules particulières, qui représente la population des cellules immunocompétentes qui résident dans le SNC. Depuis la découverte des cellules souches neurales dans certaines régions du cerveau, de nombreuses études ont permis d'établir que ces cellules participaient au renouvellement du contingent de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes à l'âge adulte, mais en aucun cas de cellules microgliales. La présence de cette dernière catégorie de cellules dans le cerveau à l'âge adulte a ainsi engendré de multipes interrogations, notamment sur le statut immunitaire du cerveau. Quelle est l'origine de ces cellules microgliales ? Quelles sont les rôles de ces cellules microgliales à l'état basal d'une part et au cours des processus pathogènes d'autre part ?

II.A. LES MEDIATEURS CELLULAIRES DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE CEREBRALE

II.A.1. La microglie

II.A.1.a. Préambule

Les cellules microgliales ont été historiquement observées par le neurologue et célèbre histologiste Franz Nissl, qui les distingua d'après la forme en baguette de leurs noyaux. En 1927, Pio del Rio Hortega avança, d'après des observations histologiques, que les cellules microgliales (alors nommées cellules d'Hortega) étaient des cellules distinctes des autres cellules gliales. Plus tard, il émit l'hypothèse selon laquelle ces cellules dériveraient des cellules mononucléaires circulantes et pourraient passer d'un état quiescent où elles sont ramifiées à un état activé où elles prennent une forme amiboïde [139].

II.A.1.b. Origine et maintien à l'âge adulte de la population microgliale

Il faudra attendre plusieurs décennies pour clarifier l'origine des cellules microgliales, qui ne dérivent pas, contrairement aux neurones et aux astrocytes, des cellules souches neurales [268]. On sait, à présent, que ces cellules de la microglie à l'état basal constituent 5 à 20% des cellules gliales totales et qu'elles sont plus représentées dans la matière grise. Elles

dérivent des précurseurs de la souche myéloïde, qui auraient peuplé le SNC au cours du développement embryonnaire et au cours de la première semaine de vie postnatale jusqu'à la formation définitive de la BHE. Lorsqu'ils infiltrent le parenchyme cérébral, les précurseurs myéloïdes des cellules microgliales présentent une forme ronde sans prolongement ou très peu : on parle de la forme amiboïde de ces cellules [139]. C'est dans le parenchyme cérébral, où ils sont isolés du compartiment sanguin, que s'effectue leur différenciation en cellules de la microglie. Ces cellules adoptent alors leur forme quiescente, caractérisée par la présence de nombreuses et fines ramifications ; on parle alors de la forme ramifiée de ces cellules. Il semblerait que les astrocytes jouent un rôle déterminant dans le passage de ces cellules de la forme amiboïde à la forme ramifiée au cours du développement. En effet, en culture, les cellules microgliales isolées adoptent une forme ronde de type macrophage. Si ces mêmes cellules microgliales sont placées sur une couche astrogliale, elles conservent leur forme ramifiée [278].

Dans le cerveau adulte à l'état basal, la population de cellules microgliales serait relativement stable et le maintien de son contingent est un sujet qui fait encore débat. L'une des hypothèses est que la population de cellules microgliales parenchymateuses se renouvelle par prolifération. En effet, les capacités de prolifération des cellules microgliales ont été mises en évidence lors de lésions cérébrales qui n'affectent pas la BHE. Par exemple, le nombre de cellules microgliales ayant incorporé du BrdU (un analogue de la thymidine qui marque les cellules en prolifération) dans le GD augmente à la suite de la lésion du cortex entorhinal [104]. Bien qu'il n'ait pas été clairement démontré que les cellules microgliales quiescentes soient capables de proliférer dans le cerveau sain, il a été proposé que ces cellules possèderaient de faibles capacités de prolifération leur permettant de se renouveller à l'état basal. Qu'en culture les cellules microgliales soient capables de proliférer sous l'influence du facteur stimulant la colonie monocyte/granulocyte (GM-CSF) vient conforter cette hypothèse [268].

Néanmoins, des travaux récents portant sur la transplantation de cellules souches de la moelle osseuse d'un animal donneur à un animal receveur irradié apportent des éléments nouveaux sur le renouvellement des cellules microgliales. L'animal donneur est généralement une souris transgénique qui exprime le gène de la protéine auto-fluorescente verte (GFP pour *green fluorescent protein*) dans toutes ses cellules (hormis les érythrocytes), et l'animal receveur est une souris non génétiquement modifiée qui a été soumise à de fortes irradiations de façon à ce que soit épuisé son contingent de cellules circulantes [268]. Les cellules de la moelle osseuse de l'animal donneur sont ensuite rapidement transplantées à l'animal receveur. Dans ce cas, des cellules du donneur (GFP positives) sont rapidement détectées dans les

leptoméninges et dans des régions cérébrales dépourvues de BHE (les organes circum-ventriculaires), telles que les plexus choroïdes [18,19,297]. Dans les régions cérébrales où la BHE est complète, de nombreuses cellules GFP positives sont associées aux vaisseaux sanguins et contenues dans l'espace périvasculaire (voir paragraphe sur les cellules périvasculaires) [18,19,112,297]. **Ces résultats suggèrent fortement que les macrophages des leptoméninges et les cellules périvasculaires se renouvellent en permanence dans le cerveau adulte à partir de cellules circulantes dérivées de la moelle osseuse, vraisemblalement des monocytes** (voir paragraphe II.A.2.a de l'historique scientifique).

Les observations issues de ces études concernant le renouvellement de la microglie parenchymateuse à partir de cellules circulantes dérivées de la moelle osseuse sont toutefois très divergentes. En effet, pour un protocole expérimental très similaire, certains auteurs indiquent qu'une très faible proportion de cellules microgliales parenchymateuses (à la forme ramifiée) est GFP positive, même 6 mois après la transplantation [170,297], alors que d'autres observent une forte proportion de ces cellules dans le parenchyme cérébral dès 2 à 4 mois après transplantation [111,266]. Ces divergences peuvent notamment s'expliquer par la lourdeur du protocole expérimental, qui comprend : 1) des irradiations nocives pour les cellules souches neurales et les cellules endothéliales de l'hôte ; 2) le prélévement cellulaire dans la moelle osseuse du donneur et la purification des cellules ainsi prélevées ; et enfin 3) une injection d'une grande quantité de ces cellules dans le sang de l'hôte. Ces différents traitements conduisent à un état de l'animal receveur très éloignée de l'état physiologique. Pour limiter les effets indésirables de ce protocole expérimental, d'autres approches ont été développées, telles que celle de la parabiose dans laquelle est créée une circulation sanguine croisée entre une souris sauvage et une souris transgénique GFP positive ou encore celle dans laquelle les cellules de la rate d'une souris sauvage sont préalablement marquées. Il en résulte que la contribution des cellules circulantes d'origine myéloïde au renouvellement de la population de cellules microgliales résidentes du parenchyme cérébral est minime sur une courte échelle de temps (analyse à 14 jours dans le cas de la parabiose et 3 jours dans le cas des cellules marquées de la rate) [18,170], et en légère augmentation sur une échelle de temps plus longue (quelques mois dans le cas de la parabiose)[170]. **Ceci suggère qu'une lente infiltration de cellules circulantes dérivées de la moelle osseuse dans le cerveau participe également au maintien de la population de cellules microgliales parenchymateuses à l'âge adulte**.

L'identité des cellules circulantes dérivées de la moelle osseuse impliquées dans ce renouvellement reste à déterminer clairement. Bien que la majorité de ces cellules possèdent un phénotype et des propriétés similaires à ceux des monocytes [201,266,297], il est possible

qu'une faible proportion de ces cellules soient des progéniteurs myéloïdes susceptibles de proliférer, et même des cellules souches hématopoïétiques [148,268,322]. Il est également envisageable que le cerveau contienne un petit contingent de progéniteurs microgliaux résidents issus de l'infiltration massive de cellules d'origine myéloïde au cours du développement, et que ces progéniteurs participent au renouvellement des cellules microgliales dans le cerveau adulte [268,322].

II.A.1.c. Rôles physiologiques de la microglie

Actuellement, notre connaissance des fonctions de la microglie à l'état quiescent dans le cerveau sain reste très limitée. La plupart des préparations tissulaires obtenues au cours de différentes études représentent un stress en elles-mêmes pour le cerveau, ce qui rend très difficile la caractérisation des fonctions de la microglie dans les conditions physiologiques. Récemment, une étude élégante réalisée sur des souris transgéniques qui présentent un marqueur fluorescent dans les cellules microgliales a permis d'évaluer grâce à l'utilisation d'une technique de visualisation trans-crânienne non-invasive le comportement de ces cellules à l'état quiescent [197]. Cette étude révèle que (1) la distribution des cellules microgliales quiescentes dans le cortex est relativement homogène, (2) que les corps cellulaires de ces cellules ne migrent pas, et (3) qu'en revanche, les prolongements de ces cellules sont très motiles, et présentent des signes d'extension et de rétraction alternées [197]. Ces prolongements microgliaux contactent les corps cellulaires des neurones, les astrocytes et les vaisseaux sanguins [197]. Il a alors été suggéré que les cellules microgliales quiescentes, grâce à la grande motilité de leurs prolongements, jouent un rôle de gardiens de l'intégrité du micro-environnement des neurones.

II.A.2. Les cellules périvasculaires et les péricytes

II.A.2.a. Les cellules périvasculaires

Dans le parenchyme cérébral, les cellules périvasculaires représentent une faible population de cellules du SNC, et sont localisées dans l'espace périvasculaire ou espace de Virchow-Robin, où elles sont adjacentes aux cellules endothéliales [320]. L'espace de Virchow-Robin est un espace anatomique, situé entre la membrane basale de l'endothélium capillaire et les extrémités des prolongements astrocytaires et microgliaux. Près des artères cérébrales, cet espace est relié aux espaces périvasculaires des artères sous-arachnoïdes, et l'espace périvasculaire des veinules cérébrales est, quant-à-lui, relié à l'espace sous-pial (leptoméninges). Cet espace sous-pial est relié aux ganglions lymphatiques cervicaux. Le cerveau étant dépourvu de ganglions et de canaux lymphatiques, il semblerait que l'espace de Virchow-Robin assure la fonction de drainage lymphatique du SNC [113]. Au cours de la

caractérisation des cellules périvasculaires, plusieurs noms leur ont été donnés tels que macrophages périvasculaires, microglie périvasculaire ou encore cellules de Mato, des cellules remplies de granules fluorescents. Un consensus a été récemment établi pour regrouper l'ensemble de ces cellules (constituant un groupe potentiellement hétérogènes) sous le terme de cellules périvasculaires. Ces cellules périvasculaires contribuent à former la BHE avec les astrocytes et les prolongements de cellules microgliales parenchymateuses [320].

Les cellules périvasculaires, d'origine myéloïde, dériveraient en partie des macrophages des leptoméninges (pie-mère) qui auraient migré au cours de la première semaine de vie post-natale jusqu'aux espaces périvasculaires des petits vaisseaux sanguins. A l'âge adulte, ces cellules sont en permanence renouvelées par l'infiltration de monocytes circulants et/ou par la migration des macrophages dérivés des leptoméninges (voir paragraphe II.A.1.b. de l'historique scientifique) [320]. Les fonctions immunes des cellules périvasculaires ne sont pas encore clairement établies. Il est possible que ces cellules, localisées au niveau de la première ligne de défense immunitaire contre de potentiels agents infectieux circulants dans le sang, jouent un rôle de « senseur » immunologique. Les cellules périvasculaires présentent en effet de grandes capacités d'incorporation d'éléments étrangers injectés dans l'espace périvasculaire [138,320]. Par ailleurs, les cellules périvasculaires peuvent migrer le long de l'espace de Virchow-Robin jusqu'à atteindre l'espace sous-arachnoïdien ou le liquide céphalo-rachidien [320]. Ces cellules pourraient alors quitter le cerveau pour présenter les antigènes capturés au système immunitaire périphérique. Même si ce rôle de cellule présentatrice d'antigènes en dehors du SNC reste spéculatif, les capacités de capture des antigènes étrangers par les cellules périvasculaires sont à présent avérées. Le rôle physiologique des cellules périvasculaires serait alors de nettoyer du liquide interstitiel cérébral [285].

II.A.2.b. Les péricytes

Les péricytes sont des cellules distinctes des cellules périvasculaires et sont présentes dans la plupart des tissus, en association avec les micro-vaisseaux sanguins, en particulier les artérioles, les veinules et les capillaires sanguins. Les veinules post-capillaires présentent la plus grande densité de péricytes. Dans les tissus périphériques, les péricytes ont une forme particulière avec un corps cellulaire petit et ovale et des prolongements qui recouvrent environ 30% de la circonférence capillaire. Dans le SNC, ils adoptent la même morphologie avec des prolongements plus courts. Ils sont classiquement contenus à l'intérieur de la membrane basale qui entoure les vaisseaux sanguins (côté endothélial de la membrane basale) et sont étroitement liés avec les cellules endothéliales sous-jacentes. Lorsqu'ils sont au voisinage des

petits vaisseaux dépourvus de cellules musculaires lisses, ils reposent directement sur les cellules endothéliales [243,285].

Les rôles physiologiques des péricytes restent à définir clairement, et la plupart des études de leurs fonctions ont été réalisées sur des tissus périphériques. Dans ces tissus, ils réguleraient les fonctions des cellules endothéliales et veilleraient à l'intégrité du mur endothélial [243,285]. De plus, dans les petits vaisseaux sanguins dépourvus de cellules musculaires lisses, ils pourraient assumer la fonction de régulation du flux sanguin grâce à des propriétés contractiles [243,285]. D'autres rôles ont été proposés notamment dans le SNC, mais ces rôles restent sujets à controverse. Par exemple, il a été proposé qu'une catégorie de péricytes pourrait être des progéniteurs susceptibles de se différencier en macrophages ou en microglie [285].

II.A.3. Les cellules dendritiques

Il est reconnu que le parenchyme cérébral est dépourvu de cellules dendritiques [113], qui sont des cellules immunitaires responsables du déclenchement de la réponse immunitaire adaptative impliquant les lymphocytes T et B. Une population de cellules dendritiques a été idendifiée chez le rat dans les méninges et dans les plexus choroïdes, ces derniers étant localisés dans les ventricules cérébraux et impliqués dans la sécrétion du liquide céphalo-rachidien [113]. L'absence de cellules dendritiques dans le parenchyme cérébral a renforcé l'hypothèse selon laquelle le rôle de cellules présentatrices d'antigène était assuré par les cellules microgliales et les cellules périvasculaires. Il semblerait que, sous certaines conditions pathologiques infectieuses ou non-infectieuses, des cellules dendritiques ont été détectées dans le parenchyme cérébral [113,194]. Ces cellules identifiées par la détection immunohistochimique de marqueurs spécifiques de cellules dendritiques (OX-62) apparaissent dans le parenchyme cérébral même après l'épuisement expérimental en cellules périvasculaires et ne sont, en revanche, plus présentes après l'épuisement en cellules mononucléaires circulantes par irradiation lors de lésion excitotoxique du striatum par l'acide kaïnique [194]. Ces résultats suggèrent que les cellules dendritiques dérivées du sang pourraient pénétrer et infiltrer le parenchyme cérébral dans un contexte pathologique.

II.A.4. Identification des différentes catégories de cellules immunocompétentes

Figure RB4

L'identification du phénotype des différentes cellules immuno-compétentes cérébrales citées ci-dessus est un enjeu important pour étudier les mécanismes cellulaires responsables

de la neuro-inflammation. Toutefois, au regard de l'origine commune de ces différentes populations cellulaires (les cellules souches hématopoïétiques), il est difficile de trouver des marqueurs pertinents pour discriminer une population d'une autre. Par exemple, les monocytes circulants, les cellules périvasculaires et les cellules microgliales résidentes présentent CD45, le marqueur commun à tous les leucocytes. Ainsi, de nombreuses études utilisent des marqueurs qui ne permettent pas de discriminer ces différentes populations cellulaires, et englobent sous le terme de cellule microgliale l'ensemble des différentes populations présentées ci-dessus (péricytes, cellules périvasculaires, monocytes/macrophages infiltrants) [101]. La caractérisation du phénotype des différentes populations cellulaires est d'autant plus délicate qu'en culture, les cellules microgliales, privées de l'environnement particulier du SNC, adoptent une morphologie et un phénotype différents [101]. Par ailleurs, la microglie quiescente, les cellules périvasculaires, les monocytes infiltrants et les éventuelles cellules dendritiques sont toutes capables, sous certaines conditions physio-pathologiques, de s'activer et, il est fort probable que leur phénotype soit altéré au cours de ces processus d'activation [101]. A l'heure actuelle, il n'existe pas de marqueurs qui permettrait de distinguer de façon certaine à partir de coupes histologiques les cellules microgliales résidentes activées des macrophages ayant infiltrés le parenchyme cérébral. D'après la revue du Dr. Guillemin en 2004, seuls les critères morphologiques (aspect de rose pour les macrophages et épineux pour les cellules microgliales au microscope électronique) et biochimiques (activité myélopéroxidasique exclusive des macrophages) permettent de trancher définitivement entre les deux populations cellulaires. La **figure RB4** établie d'après la revue du Dr. Guillemin, récapitule la sélection des marqueurs qui permettent au mieux, au regard des outils et des techniques actuellement disponibles, d'identifier par leur phénotype les cellules immunocompétentes du tissu nerveux. La localisation des cellules (parenchyme/espace périvasculaire) est également un élément de discrimination important [101].

Il apparaît alors que le marqueur CD11b est commun à toutes les populations cellulaires d'origine myéloïde, et permet de discriminer les cellules immunocompétentes des autres catégories de cellules du SNC (astrocytes, oligodendrocytes, neurones). En revanche, le marqueur CD14 (également appelé récepteur des lipopolysaccharides (LPS), des composants essentiels de la membrane externe de nombreuses bactéries) est fortement présent à la surface des monocytes, des macrophages tissulaires et des cellules périvasculaires, faiblement présent à la surface des neutrophiles, et n'est pas détecté à la surface des cellules microgliales parenchymateuses quiescentes [4,101]. Bien que les cellules microgliales parenchymateuses isolées activent l'expression de *CD14* en culture, aucune étude ne montre que les cellules microgliales résidentes du parenchyme cérébral présentent le marqeur CD14 à leur surface

lorsqu'elles s'activent. CD14 apparaît alors comme un bon candidat pour discriminer les cellules microgliales résidentes des cellules périvasculaires et des macrophages infiltrants dans le SNC. Sa détection, par des techniques histologiques, serait beaucoup moins difficile à mettre en œuvre, que ce qui a été utilisé par les approches précédemment citées (irradiation et transplantation, parabiose et cellules marquées de la rate; voir paragraphe II.A.1.b.).

II.A.5. Le concept de microglie activée

Bien que la microglie soit dérivée de progéniteurs myéloïdes tout comme les macrophages résidents des autres tissus, elle présente dans le cerveau adulte à l'état basal un phénotype différent, caractérisé par une faible activité de phagocytose, un faible niveau d'expression de CD45 (l'antigène commun à tous les leucocytes) et une très faible représentation à leur surface des ligands et/ou récepteurs essentiels aux fonctions immunes classiques de ces macrophages (fonctions de phagocytose, de cytotoxicité et pro-inflammatoires). En revanche, la comparaison des analyses histologiques entre le cerveau sain et le cerveau pathologique, issus de différents animaux ou des patients décédés, a révélé que la microglie avait une morphologie et un phénotype modifiés dans les conditions pathologiques. Cette microglie « réactive » détectée dans le cerveau en souffrance présente de nombreux traits communs avec les macrophages. La microglie ramifiée quiescente nécessiterait alors des processus d'activation et/ou de maturation pour acquérir un phénotype similaire à celui des macrophages. Ces processus d'activation comprendraient non seulement des modifications morphologiques affectant les corps cellulaires et les prolongements des cellules microgliales, mais aussi l'activation de nombreux gènes, notamment les marqueurs de différenciation caractéristiques des macrophages [148]. La microglie activée est également une source importante de médiateurs moléculaires de l'inflammation, tels les cytokines pro-inflammatoires (voir paragraphe II.B.2 de l'historique scientifique).

Néanmoins, le concept de microglie activée, bien que communément employé, mérite une meilleure définition. Il apparaît de plus en plus clair que la population de cellules microgliales activées, et regroupées au niveau des sites de lésions (voir paragraphe II.A.6 sur microgliose réactionnelle), est hétérogène. La stratégie d'irradiation de souris sauvage suivie d'une transplantation de cellules dérivées de la moelle osseuse GFP positives a permis d'établir que, à la suite d'une lésion cérébrale, le contingent de cellules microgliales activées dans la zone de lésion est constitué des cellules microgliales résidentes (GFP négatives), qui sont passées d'un état quiescent à un état activé, et des cellules périvasculaires et/ou les macrophages infiltrants dérivés des monocytes circulants (GFP positifs) qui se sont différenciés en cellules de type microglial [18,111,170,297].

Ces observations ont remis en question la notion de transformation morphologique associée à l'activation des cellules microgliales résidentes. En effet, historiquement, d'après des colorations histologiques, il avait été principalement observé trois formes de la microglie: la forme ramifiée, la forme amiboïde et une forme intermédiaire comprenant des ramifications plus épaisses et plus courtes et un corps cellulaire hypertrophié [278]. Cette distinction morphologique avait ensuite été corrélée à un statut d'activation en fonction du phénotype moléculaire (immunoréactivité des marqueurs de différenciation), la forme ramifiée correspondant à l'état quiescent (faible immunoréactivité pour CD11b), la forme amiboïde correspondant à la transformation en phagocyte, et la forme intermédiaire correspondant à un état activé (forte immunoréactivité pour CD11b) [278]. Etant donné que la forme amiboïde était observée rapidement après une lésion du SNC, elle a été longtemps considérée comme un indice d'activation précoce des cellules microgliales résidentes. Ce point de vue est à présent fortement remis en question, et la forme amiboïde est de plus en plus considérée comme un indice de la différenciation des cellules périvasculaires et/ou macrophages infiltrants en cellules microgliales parenchymateuses. La forme « hypertrophiée », caractérisée par une forte présence des marqueurs de surface (CD11b notamment), correspondrait alors à de la microglie activée, et résulterait soit (1) de la transformation des cellules microgliales quiescentes, soit (2) de la différenciation des macrophages périvasculaires et/ou infiltrants, ou soit (3) d'une combinaison de ces deux processus.

II.A.6. Microgliose réactionnelle

Un autre sujet qui reste en débat concernant la microglie est le rôle de la microgliose réactionnelle. Ce processus correspond à la mise en place d'une accumulation de cellules microgliales activées. Cette accumulation autour des neurones pourrait contribuer aux dommages tissulaires. En effet, l'inhibition de l'activation microgliale par différentes stratégies moléculaires (bloqueurs de radicaux libres, antibiotiques de la famille des tétracyclines,…) réduit l'étendue des dommages dans les cerveaux d'animaux soumis à une ischémie cérébrale expérimentale [318]. En culture, la présence des cellules microgliales activées (et/ou macrophages) est délétère pour les neurones et les oligodendrocytes [318]. Toutefois, dans certaines conditions, la microgliose réactionnelle pourrait présenter des vertus bénéfiques. En effet, les animaux utilisés comme modèle de la maladie d'Alzheimer présenteraient une microglie activée (et/ou les macrophages infiltrants) qui conduirait à une réduction de l'accumulation des peptides amyloïdes β par phagocytose suivie de leur dégradation [109]. Par ailleurs, la microglie activée serait une source potentielle de facteurs neurotrophes, tels que le NGF, le BDNF ou encore le GDNF [109,193], dont les fonctions neuroprotectrices sont avérées. Les rôles de la microglie activée pourraient être dépendants

des situations physio-pathologiques et des molécules qu'elles synthétisent. Un des rôles reconnu de la microglie activée au cours de l'épileptogenèse est la synthèse des médiateurs moléculaires de l'inflammation cérébrale et, en particulier, des cytokines pro-inflammatoires (voir paragraphe II.B.2. de l'historique scientifique). Ces cytokines pro-inflammatoires pourraient jouer un rôle déterminant lors de la phase d'épileptogenèse.

II.B. LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES : DES MEDIATEURS MOLECULAIRES DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE CEREBRALE

II.B.1. Présentation et expression cérébrale

II.B.1.a. L'interleukine 1

Figure RB5

Sous le nom de l'interleukine-1 (IL-1) n'est pas désigné une protéine unique, mais une famille de protéines. La famille de l'interleukine-1 est constituée de deux molécules agonistes : IL-1α et IL-1β, d'une protéine antagoniste IL-1 Ra (pour *receptor antagonist*), de deux types de récepteurs membranaires : IL-1 récepteur de type 1 (IL-1 RI) et IL-1 récepteur de type 2 (IL-1 RII), d'une protéine accessoire des récepteurs IL-1 RAcP (pour *receptor acessory protein*), et des formes solubles des récepteurs de type 1 et 2, IL-1 RIs et IL-1RIIs [161,316]. Les régulations de l'expression, de l'activation et de la libération de l'IL-1 par les cellules sont encore méconnues, et les travaux visant à caractériser ces processus ont été réalisés sur des cellules périphériques, principalement les monocytes. Toutefois, il est vraisemblable que les mêmes mécanismes soient impliqués dans la production d'IL-1 dans le cerveau.

IL-1α et IL-1β sont les produits d'expression des gènes différents qui ont été identifiés dans tous les mammifères où ils ont été recherchés, dont l'homme [164], le rat et la souris [100]. Chez l'homme, ces gènes sont situés sur le chromosome 2, et sont distants de 50 kb (locus q13 pour l'*IL-1α* et locus q13-21 pour l'*IL-1β*). Les deux cytokines sont synthétisées sous la forme de précurseurs de 31 kDa chacun. La pro-IL-1α est biologiquement active et est coupée par les calpaïnes, des protéases cytoplasmiques activées par le calcium, pour former l'IL-1α. En revanche, la pro-IL-1β est biologiquement inactive et requiert une maturation protéolytique par la caspase-1, également appelé ICE (pour *IL-1 converting enzyme*), pour former la protéine IL-1β active de 17 kDa. Les formes pro-IL-1α et IL-1α sont majoritairement intracellulaires, bien qu'une libération de ces deux formes puisse exister au cours des processus de mort cellulaire. L'IL-1β est sécrétée dans l'environnement

extracellulaire constituant ainsi la forme extracellulaire prédominante de l'IL-1; les mécanismes qui régulent cette voie de sécrétion n'ont pas encore été élucidés. Par ailleurs, l'affinité de liaison de l'IL-1β pour les récepteurs est plus forte que celle de l'IL-1α. Malgré seulement 26% d'identité dans leur séquence en acides aminés, ces deux cytokines exercent des effects biologiques similaires, en se liant au récepteur membranaire de type 1, qui est associé à IL-1 RAcP pour former un complexe capable de transduire un signal intracellulaire. L'IL-1 RII ne possède pas de domaine intracellulaire, et constitue un récepteur leurre susceptible de capturer l'IL-1 sans provoquer d'effet biologique. En outre, la neutralisation des effets biologiques de l'IL-1 peut impliquer une modification du taux d'expression des formes solubles des récepteurs IL-1 RIs et IL-1 RIIs [3,161,242,316].

Le troisième ligand de ces récepteurs est l'IL-1 Ra, un antagoniste compétitif naturel généralement décrit dans l'inflammation périphérique comme étant synthétisé par les mêmes cellules que celles qui produisent l'IL-1. Il existe trois isoformes intracellulaires de l'IL-1 Ra et une isoforme sécrétée, produites par différence d'épissage du transcrit primaire du même gène. Les fonctions des isoformes intracellulaires n'ont pas été élucidées. En revanche, l'isoforme secrétée fonctionne comme un antagoniste compétitif qui lie préférentiellement l'IL-1 RI. Actuellement, seule la forme sécrétée de l'IL-1 Ra a été détectée dans le cerveau. Par ailleurs, l'analyse du génome humain a permis de suspecter l'existence de nouveaux ligands et récepteurs dans la famille de l'IL-1 grâce aux identités de séquences qu'ils présentent avec les membres classiques de la famille IL-1. Toutefois, les fonctions associées à ces nouveaux membres putatifs sont actuellement inconnues [3 ,242].

La signalisation intracellulaire du complexe IL-1/IL-1 RI/IL-1 RAcP passe par le recrutement d'une kinase associée au domaine cytoplasmique de l'IL-1 RAcP, IRAK (pour IL-1 Receptor Associated Kinase), qui active une série complexe d'événements intracellulaires impliquant le facteur de transcription nucléaire κB (NF-κB), et des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK). Ces facteurs de transcription activent l'expression de nombreux gènes liés à l'inflammation [161] (***Figure RB5***).

Des sites de liaison de l'IL-1 ont été détectés dans le cerveau de rat adulte, où ils apparaissent abondant dans l'hippocampe ou encore dans l'hypothalamus [73]. Dans les conditions physiologiques, les neurones granulaires du GD et les neurones pyramidaux de la CA synthétisent en effet l'IL-1 RI [79]. L'ARNm de l'IL-1 RAcP est, quant à lui, fortement détecté dans l'hippocampe de rat adulte [123], ce qui suggère que le récepteur peut transduire une signalisation intracellulaire. En revanche, la présence des ligands dans le cerveau sain est controversée, même s'il est admis qu'ils soient présents dans certaines régions du cerveau à

de faibles concentrations [306]. Ces résultats dans leur ensemble sont en faveur d'un rôle physiologique de l'IL-1 dans l'hippocampe, qui reste à caractériser.

II.B.1.b. Le facteur de nécrose tumorale α

La famille du facteur de nécrose tumorale α (TNF-α pour *Tumor Necrosis Factor*) comprend une molécule agoniste, le TNF-α, susceptible de se lier avec deux types de récepteurs membranaires appartenant à la superfamille des récepteurs aux neurotrophines de faible affinité: le récepteur de type I (TNF-RI pour *TNF receptor*) encore appelé récepteur p55, et le récepteur de type II (TNF-RII) encore appelé récepteur p75. Ces récepteurs existent aussi sous forme soluble, TNF-RIs et TNF-RIIs, servant vraisemblablement de récepteurs leurres pour neutraliser les effets biologiques du TNF-α extracellulaire. Ces récepteurs sont également susceptibles de lier de nombreux autres facteurs que le TNF-α, ce qui rend difficile la caractérisation des actions propres au TNF-α dans l'animal entier. Par exemple, la lymphotoxine α, également appelé TNF-β, et la lymphotoxine β sont capables de lier aussi bien TNF-RI que TNF-RII.

Le TNF-α a initialement été découvert dans le sérum de souris au cours de l'endotoxémie [38]. Le gène du TNF-α a été identifié et cloné chez l'homme [216,264], puis à partir d'autres mammifères. Le TNF-α est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 26 kDa, une protéine transmembranaire de type II, qui produit après coupure protéolytique par une métalloprotéase appelé TACE (pour *TNF alpha converting enzyme*), un peptide de 17 kDa. La forme soluble et extracellulaire du TNF-α est un homotrimère du peptide de 17 kDa [97,314]. Cet homotrimère tend à se dissocier à de très faibles concentrations, n'exerçant plus d'effet biologique lorsqu'il est dissocié [314]. Le gène du TNF-β est différent de celui du TNF-α. TNF-β de 25 kDa présente 35% d'identité avec TNF-α. La forme active du TNF-β est également un homotrimère [316].

Le TNF-α est une cytokine pléïotrope, exerçant de multiples effets biologiques par l'intermédiaire de son interaction avec les récepteurs TNF-RI et TNF-RII [314]. Ces deux récepteurs contiennent des domaines extracellulaires riches en cystéine, capables de lier le ligand trimérique. La liaison du TNF-α à ses récepteurs sous forme d'un homotrimére engendre un signal intracellulaire [314]. Les domaines intracellulaires de ces deux récepteurs sont en revanche très différents [316]. Le domaine intracellulaire du TNF-RI possède un domaine de mort (noté DD pour « *Death domain* »), qui permet, par le recrutement d'autres domaines DD, la formation d'un complexe de récepteurs qui active de nombreuses caspases et provoque l'apoptose [314]. Le domaine intracellulaire du TNF-RII ne possède pas de

domaine DD, mais un domaine permettant l'association à des protéines TRAF (pour *TNF receptor associated factor*) qui enclenchent à leur tour une cascade de réactions intracellulaires. Les deux voies de signalisation intracellulaire engendrées par TNF-RI et TNF-RII sont complexes, et impliqueraient le facteur de transcription NF-κB ainsi que de nombreuses MAPK différentes [97].

Bien que les différents composants de la famille TNF-α aient principalement été étudiés au cours de la réaction inflammatoire périphérique, les protéines de cette famille exerceraient des rôles physiologiques dans le cerveau. En effet, des sites de liaison au TNF-α ont été identifiés dans des homogénats de cerveau [140]. En culture, les neurones isolés à partir de différentes régions cérébrales expriment *TNF-RI* [45], et les deux récepteurs ont été retrouvés à la surface des oligodendrocytes [283,321]. Enfin, les récepteurs des deux types ont été détectés dans le cortex et le corps calleux de la souris adulte [7,283], ce qui suggère une expression constitutive de leurs gènes dans le cerveau adulte. Tout comme pour l'IL-1, la présence de TNF-α dans le cerveau sain est encore sujet à controverse [306]. En culture, les cellules microgliales produisent cette cytokine.

II.B.1.c. L'interleukine-6

La famille interleukine-6 (IL-6) comprend un ligand, l'IL-6, un récepteur, l'IL-6R (pour *IL-6 receptor*) et une glycoprotéine transmembranaire de 130 kDa, gp130. L'IL-6R et la gp130 existent également sous forme soluble. L'IL-6R soluble (IL-6Rs) présente majoritairement des effets agonistes de la signalisation de l'IL-6 (voir ci-dessous), alors que la forme soluble de la gp130 (gp130s) neutralise les effets de l'IL-6 (voir ci-dessous) [239,252]. Le gène de l'IL-6 a été isolé chez l'homme et cloné [103], de même que celui d'autres mammifères. *IL-6* est localisé, chez l'homme, en 7q21. Cette cytokine est synthétisée sous la forme d'un précurseur, puis libérée après coupure protéolytique par des protéases encore non identifiées. Tout comme l'IL-1 et le TNF-α, l'IL-6 est une cytokine pléïotrope, exerçant ses multipes effects biologiques par l'intermédiaire de l'IL-6R couplé à la gp130 transmembranaire. Sur les cellules cibles, l'IL-6 se lie d'abord à l'IL-6R, puis le complexe IL6/IL-6R s'associe à la gp130. Le complexe actif IL-6/IL-6R/gp130 est un hexamère, composé d'un dimère d'IL-6, d'un dimère d'IL-6R et d'un dimère de gp130. C'est la formation d'un homodimère de gp130 qui conduit à l'activation des JAK. Ces dernières entraînent à leur tour de nombreuses cascades de réactions intracellulaires, qui implique vraisemblablement les protéines STAT et certaines MAPK. L'IL-6Rs, généré par coupure protéolytique de la forme membranaire ou par différence d'épissage du transcrit primaire, peut conduire à l'activation des voies de signalisation de l'IL-6 dans les cellules exprimant uniquement *gp130* et non *IL-6R*. On parle alors de trans-signalisation. En revanche, la gp130s

semble neutraliser les effets biologiques de l'IL-6. Enfin, gp130 est impliquée dans la transduction de la signalisation intracellulaire de nombreuses autres molécules [239,252].

Dans le cerveau, l'*IL-6R* est exprimé par les neurones, tandis que la gp130 est retrouvée aussi bien à la surface des neurones qu'à celle des astrocytes. Par ailleurs, le variant de l'ARNm de l'IL-6Rs a été détecté dans le cerveau humain, bien que sa source cellulaire n'ait pas encore été identifiée [300]. Dans l'hippocampe de rat adulte, les neurones granulaires du GD et les neurones pyramidaux de la CA contiennent l'ARNm de l'IL-6, qui se retrouve co-localisé avec celui de l'IL-6R [254]. Cette cytokine serait donc impliquée dans les communications cellulaires autocrines et paracrines du cerveau sain.

II.B.2. Régulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires au cours de l'épileptogenèse

Le nombre de cellules exprimant l'*IL-1α* est augmenté dans le lobe temporal de pateints atteints d'épilepsie du lobe temporal [130], et une augmentation de la concentration en IL-6 a été mesurée dans le liquide céphalo-rachidien prélevé environ 15 h après la survenue d'une crise [214]. Malgré ces observations, la régulation de l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, TNF-α et IL-6 dans les animaux atteints d'épilepsies expérimentales du lobe temporal a reçu moins d'attention que celle des animaux qui présentent des agressions cérébrales associées à une perte neuronale, dans le cas d'ischémie cérébrale par exemple.

Le taux d'ARNm de l'IL-1β, de l'IL-6 et du TNF-α est rapidement augmenté dans l'hippocampe de rat à la suite d'un *status epilepticus* (*SE*) induit par l'injection systémique d'acide kaïnique [177]. L'augmentation rapide du taux des ARNm de l'IL-1β a par la suite été confirmée dans d'autres animaux qui présentent une épilepsie expérimentale sauf dans le cas d'une induction du *SE* par la pilocarpine où cela n'a pas encore été étudiée. En particulier, les animaux dont le *SE* est induit par l'acide kaïnique montrent une augmentation rapide et transitoire du taux d'ARNm de l'IL-1β dans l'hippocampe, puisque 1) cette augmentation est observée dès 2 h après la mise en place du *SE*, 2) qu'elle atteint son pic apparent 12 h plus tard et 3) que le retour au taux de base est observé 4 j plus tard [69,152,169]. L'augmentation du taux de l'ARNm de l'IL-1β dans l'hippocampe est suivie d'une augmentation de la synthèse de cette cytokine détectée dès 4 h avec un pic apparent observé à 24 h [203,302]. Les augmentations rapides des taux d'ARNm de TNF-α et de l'IL-6 ont récemment été confirmées après mise en place du *SE* par l'acide kaïnique [152] et également observées à la suite du *SE* induit par stimulation électrique de l'hippocampe ventral [55].

Les cellules responsables de la synthèse de l'IL-1β, du TNF-α et de l'IL-6 seraient les cellules microgliales activées (et/ou les monocytes infiltrants), bien que la synthèse de l'IL-6 soit également observée dans les astrocytes [69 ,70,130 ,240 ,293 ,302]. Il est possible que les astrocytes synthétisent également de l'IL-1β dans un second temps, comme cela est observé dans le cortex à la suite de l'injection d'un agent excitotoxique [130]. Par ailleurs, l'IL-1β est très présente dans les neurones pyramidaux de CA3 et quelques interneurones du hile 60 j après la mise en place du *SE* lorsque celui-ci est induit par stimulation électrique de l'hippocampe ventral du rat [55]. Le mode d'induction du *SE* semble également moduler la production de TNF-α, puisque les cellules gliales synthétisent cette cytokine 18 h et 48 h après mise en place du *SE* par stimulation électrique de l'hippocampe ventral [55], alors que ce sont les neurones de CA1 et de CA3 qui la produisent 4 h après mise en place du *SE* par l'acide kaïnique [130]. Enfin, les cytokines pro-inflammatoires seraient libérer dans le milieu extracellulaire à la suite du *SE*, comme le suggère une étude ménée sur des coupes d'hippocampes placées en culture et préparées à partir de rats ayant développé le *SE* [49].

II.B.3. Rôles des cytokines pro-inflammatoires au cours de l'épileptogenèse ?

Les premières preuves de l'implication des cytokines pro-inflammatoires dans le développement des épilepsies proviennent d'essais cliniques visant à déterminer l'efficacité de l'immunothérapie à base d'IL-1β ou de TNF-α contre certains cancers chez l'homme. En effet, certains des patients traités développaient des crises de type épileptique [178,233].

II.B.3.a. Les cytokines pro-inflammatoires sont-elles pro ou anti-épileptogènes ?

Cas de l'interleukine 1β

Le développement d'une épilepsie du lobe temporal avec sclérose de l'hippocampe pourrait en partie impliquer une prédisposition génétique portée par le gène de l'IL-1β [134]. En effet, cette prédisposition serait liée au polymorphisme d'un seul nucléotide dans la région du promoteur du gène de cette cytokine pro-inflammatoire qui consiste en la substitution d'une cytosine (allèle 1) par une thymine (allèle 2) en position -511. En culture, les monocytes des porteurs de l'allèle 2 produisent plus d'IL-1β [305]. Cet allèle 2 serait plus fréquent chez les patients atteints d'épilepsies partielles du lobe temporal [134 ,213]. En outre, le risque de développer des convulsions fébriles dans l'enfance est accru chez les individus porteurs de l'allèle 2 [305]. Il se pourrait alors que la production plus importante de l'IL-1β par les cellules qui expriment ce gène chez les individus porteurs favorise non

seulement le développement de convulsions fébriles dès l'enfance, mais aussi le devenir épileptique du cerveau à l'âge adulte. Une forte proportion (environ 30%) de patients atteints d'épilepsies du lobe temporal avec sclérose de l'hippocampe présente un historique de convulsions fébriles prolongées (>15 min) dans l'enfance, et cette proportion est encore plus importante chez les individus porteurs de l'allèle 2 [135].

Ceci est cohérent avec le rôle pro-épileptogène de l'IL-1β démontré sur les animaux soumis à une épilepsie expérimentale. Ainsi, l'injection de cette cytokine dans l'hippocampe, 10 min avant l'acide kaïnique, augmente la durée des crises développées, cet effet étant totalement aboli lorsque cette cytokine est injectée en combinaison avec l'IL-1 Ra [302]. De plus, l'injection i.h. d'IL-1β accélère également le déclenchement du *SE* et augmente la durée des crises des animaux traités à la bicuculline [303]. Les injections multiples i.h. ou i.c.v d'IL-1 Ra diminuent respectivement le nombre et la durée de crises d'épilepsie des rats traités à l'acide kaïnique [207,304], et le nombre de crises sévères développées par les rats à la suite de stimulation électrique de leurs hippocampes [55]. Par ailleurs, les souris transgéniques qui sur-exprime l'*IL-1 Ra* humaine dans leurs astrocytes présentent un retard dans le déclenchement du *SE* induit par la bicuculline [304], tout comme pour les souris transgéniques dont le gène de l'IL-1 RI a été invalidé [303]. Enfin, l'injection de l'IL-1 Ra dans l'hippocampe de souris dont le gène de l'IL-1 RI a été invalidé ne provoque aucun effet supplémentaire sur le déclenchement du *SE* par la bicuculline [303]. **L'ensemble de ces résultats indiquent que l'IL-1β est pro-épileptogène et que l'IL-1 Ra, en bloquant la signalisation de l'IL-1β par l'IL-1 RI, est anti-épileptogène.** La seule étude qui conclut sur un effet anti-épileptogène de l'IL-1β exogène a été réalisée récemment sur des rats soumis à des stimulations électriques répétées de leurs amygdales [251] et utilisait des doses très inférieures de la cytokine pro-inflammatoire par rapport à celles utilisées dans les autres études précédemment citées. Cette dernière observation suggère que l'effet de l'IL-1β sur la mise en place des épilepsies dépend non seulement de la concentration de cette cytokine dans le cerveau, mais aussi de la durée de l'exposition du tissu à cette cytokine. La sur-production d'IL-1β par les leucocytes humains isolés à partir de porteurs de l'allèle 2 revêt alors, selon cette dernière hypothèse, toute son importance.

Néanmoins ces dernières années, l'association entre la fréquence de l'allèle 2 et les épilepsies du lobe temporal avec sclérose de l'hippocampe n'a pas été retrouvée sur différentes cohortes d'origine éthnique différente [34,41 ,107 ,132,206]. Il en est de même pour l'association entre la fréquence de cet allèle et les convulsions fébriles [105,141,286 ,289]. Les raisons de ces divergences peuvent être multiples. L'une d'elles est

la diversité des éthnies sur lesquelles ont été réalisées ces études au regard de la variabilité de la fréquence de ce polymorphisme du gène de l'IL-1β. En effet, l'allèle 2 est plus fréquent dans les populations africaines et asiatiques (respectivement 60% et 45%) que dans les populations blanches d'origine européenne (35%) [34]. Une meilleure sélection des témoins est donc un élément essentiel pour les prochaines études. Une autre raison envisageable est le petit nombre de patients étudiés qui réduit la puissance du test statistique. Enfin, il est également probable que plusieurs gènes soient impliqués dans la prédisposition génétique à développer des épilepsies du lobe temporal.

Les autres cytokines pro-inflammatoires ?

Les rôles respectifs du TNF-α et de l'IL-6 sur la mise en place des épilepsies sont encore actuellement sujets à controverse. La sur-expression du gène de TNF-α dans les neurones de la souris provoque une inflammation chronique qui favorise le développement de maladies démyélinisantes et la survenue de crises de type épileptique chez ces souris transgéniques [130]. Au contraire, la sur-expression du gène de TNF-α dans les astrocytes de la souris entraîne une diminution du nombre et de la durée des crises développés au cours du *SE* induit par l'acide kaïnique [13]. Par ailleurs, l'injection i.p. de TNF-α humain augmente la sévérité des crises induite par une stimulation amygdalienne chez le rat « kindlé » et la durée des activités électriques de type épileptique [261], alors que l'injection de TNF-α dans l'hippocampe avant celle d'acide kaïnique diminue le nombre et la durée des crises développées par les rats [13]. **Il est possible que le TNF-α puisse exercer un rôle pro-épileptogène ou un rôle anti-épileptogène selon le contexte**.

Ces effets antagonistes seraient dépendants du type de récepteur sur lequel se fixe le TNF-α. En effet, des souris transgéniques dont l'expression des gènes des deux récepteurs du TNF-α a été invalidée développent des crises plus longues après traitement à l'acide kaïnique [13]. Le même effet pro-épileptogène est observé chez les souris dont seul l'expression du gène du TNF-RII (p75) a été invalidé, alors que l'invalidation uniquement de l'expression du gène du TNF-RI (p55) chez les souris a des effets anti-épileptogènes [13]. **Ainsi, le TNF-α pourrait exercer des effets anti-épileptogènes par le biais de TNF-RII (p75) et des effets pro-épileptogènes par le biais de TNF-RI (p55)**.

L'administration intra-nasale d'IL-6 1 h avant l'injection i.p. de PTZ accélère le déclenchement du *SE* et la durée des crises développées [133]. En outre, les souris qui sur-expriment *IL-6* dans leurs astrocytes adoptent un comportement de type épileptique à la suite de traitements à base de doses sous-convulsivantes d'acide kaïnique ; cette plus grande susceptibilité à développer des crises n'étant pas observée suite au traitement à base de pilocarpine [245]. En revanche, l'invalidation du gène de l'IL-6 chez les souris favorise la

survenue de façon spontanée de crises épileptiques [36] et le développement de crises à la suite du traitement à l'acide kaïnique [215].

II.B.3.b. Les cytokines pro-inflammatoires sont-elles neurotoxiques ou neuroprotectrices ?

Les cytokines pro-inflammatoires, IL-1β et TNF-α, présentent des effets neurotoxiques dans le cerveau en souffrance. En effet, l'administration d'IL-1β ou de TNF-α chez les animaux soumis à une ischémie expérimentale exacerbe les dommages dans le cerveau [3,265,316], alors que l'injection d'IL-1 exogène n'engendre aucun dommage dans le cerveau sain [3,316]. En outre, l'injection intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v) d'anticorps anti-IL-1β ou d'anticorps anti-TNF-α neutralisant les effets biologiques de ces deux cytokines, diminue la taille de la zone nécrotique et atténue les déficits neurologiques à l'issue de l'ischémie cérébrale [3,117,316]. De même, l'injection d'IL-1 Ra diminue également la taille de la zone nécrotique et réduit la perte des neurones [3,316]. Ces effets de l'IL-1 Ra seraient associés au blocage de la signalisation de l'IL-1, même si cette cytokine semble exercer dans l'hippocampe des effets biologiques propres indépendamment de l'IL-1 RI [3,162]. Enfin, les souris génétiquement modifiées confirment le rôle neurotoxique de l'IL-1β, puisque l'invalidation de l'expression des gènes de l'IL-1α et de l'IL-1β réduit la taille de la zone nécrotique induite par ischémie expérimentale ainsi que le volume de l'œdème, alors que les dommages cérébraux dus à l'ischémie sont exacerbés lorsque le gène de l'IL-1 Ra est invalidé [3,30]. En revanche, les souris génétiquement modifiées où les gènes des deux types de récepteurs au TNF-α ont été invalidés présentent une zone nécrotique plus importante à la suite l'induction d'une ischémie expérimentale [265]. Ceci suggère un effet neuroprotecteur du TNF-α endogène et contredit les résultats précédemment cités. Toutefois, ces derniers récepteurs interviennent dans la transduction de la signalisation intracellulaire de nombreuses autres protéines, et il se pourrait alors que leur invalidation ait bloqué l'effet neuroprotecteur d'un autre facteur que le TNF-α. Les expériences où le TNF-α ou l'anticorps anti-TNF-α sont injectés semblent alors plus pertinentes que celles qui utilisent des souris génétiquement modifiées et indiquent un effet neurotoxique de cette cytokine pro-inflammatoire (voir ci-dessus). Par ailleurs, il est possible que les effets neurotoxiques du TNF-α soient plus importants que ceux de l'IL-1β, puisque l'injection du TNF-α exogène provoque à elle seule des lésions dans la moelle épinière [3,316]. Enfin, l'IL-1β et le TNF-α exerceraient une <u>action synergique sur la mort neuronale</u>. En effet, la présence combinée d'IL-1β et de TNF-α dans le milieu de culture de cellules isolées à partir de cerveaux de foetus humains (composées des différentes populations cellulaires à raison de 60% de neurones, 35% d'astrocytes, 1-2% de microglie et moins de 1% d'oligodendrocytes) provoque une importante perte des neurones.

Cet effet n'est pas observé lorsque l'IL-1β ou le TNF-α sont ajoutés seuls dans le milieu de culture [43].

Contrairement à l'IL-1β et au TNF-α, la cytokine pro-inflammatoire IL-6 ne semble pas exercer des effets neurotoxiques. En effet, l'injection i.c.v. de cette cytokine à la suite de l'induction d'une ischémie expérimentale réduit les dommages cérébraux [300].

Ces résultats ont été principalement obtenus chez les animaux soumis à une ischémie expérimentale du cerveau. Les effets de ces cytokines sur le cerveau d'animaux soumis à une épilepsie expérimentale ont peu été étudiés. Toutefois, ces deux situations physio-pathologiques présentent certaines similitudes, puisque, après ischémie expérimentale, la zone cérébrale de forte réduction du flux sanguin devient nécrotique, ce qui provoque la mort de neurones. La mort des neurones vulnérables est associée à une activation de la microglie, une infiltration de leucocytes circulants, principalement des monocytes, et une astrogliose [277]. Enfin, une augmentation des taux des ARNm de l'IL-1β, du TNF-α et de l'IL-6 a rapidement lieu dans la zone ischémique et est suivie d'une augmentation de la synthèse protéique de ces cytokines [3,8,316].

Au regard de l'ensemble de ces résultats expérimentaux, il apparaît que l'IL-1β et le TNF-α sont neurotoxiques dans un contexte physio-pathologique alors que l'IL-1 Ra et l'IL-6 sont neuroprotectrices. Les effets du TNF-α endogène sur la mort neuronale restent à défnir clairement et les effets neuroprotecteurs de l'IL-6 endogène doivent être confirmés.

II.B.3.c. Les cytokines pro-inflammatoires stimulent la réponse astrocytaire

En culture, l'IL-1 isolé à partir de cellules microgliales stimule la croissance et la prolifération des astrocytes [203]. En outre, l'effet protecteur de l'IL-1 Ra sur les neurones de CA1 et de CA3 après un *SE* induit par l'acide kaïnique est associé à une diminution de l'activation des astrocytes [207]. Par ailleurs, l'hypertrophie des astrocytes après une lésion cérébrale est retardée chez les souris dont l'expression du gène de l'IL-1 RI a été invalidée [203]. **Ces résultats sont en faveur d'un rôle de l'IL-1 aussi bien sur l'activation des astrocytes que sur leur prolifération**.

Cet effet de l'IL-1 pourrait être indirect, puisque l'IL-1β induit en culture l'expression de l'IL-6 par des astrocytes de rat [203]. L'IL-6 serait une cytokine qui stimule fortement l'astrogliose. En effet, 1) en culture, cette cytokine induit la prolifération des astrocytes [300], 2) les souris transgéniques sur-exprimant l'IL-6 dans leurs neurones ou dans leurs astrocytes

présentent une importante astrogliose, 3) les souris dont l'expression du gène de l'IL-6 a été invalidée présentent une astrogliose amoindrie en réponse à une lésion cryogénique [300] ou un *SE* induit par l'acide kaïnique [215].

Les astrocytes activés par l'IL-1β et/ou l'IL-6 amorceraient, dans un second temps, la mise en œuvre de processus réparateurs. En effet, 1) l'IL-1β induit l'expression de différents facteurs de survie par les astrocytes en culture tels que le NGF (pour *nerve growth factor*) ou encore le CNTF (pour *ciliary neurotrophic factor*), 2) l'injection icv de cette cytokine induit la synthèse de NGF dans l'hippocampe, 3) l'IL-1 Ra inhibe la synthèse de NGF chez les animaux soumis à un traumatisme crânien expérimental. En outre, en culture, le TNF-α potentialise la production astrocytaire de NGF induite par l'IL-1 [203]. La production de ces facteurs neurotrophes faciliterait le maintien des neurones survivants et contribuerait à la mise en place de la régénérescence tissulaire.

La présence importante et précoce des cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-1β et le TNF-α, dans le cerveau au cours de l'épileptogenèse pourrait exacerber la mort de neurones vulnérables. Cet élément pourrait être déterminant dans la mise en place de circuits neuronaux hyperexcitables et permettre ainsi l'installation définitive des épilepsies partielles du lobe temporal. Au regard des expériences de transplantation de cellules GFP positives dérivées de la moelle osseuse d'une souris trangénique à une souris sauvage irradiée [267], il a été émis l'hypothèse que les cellules, qui ont infiltré le cerveau et se sont différenciées en cellules de la microglie, produisent à un niveau plus élevé les cytokines pro-inflammatoires. Selon cette dernière hypothèse, l'infiltration dans le cerveau de monocytes/ macrophages, qui produisent fortement ces cytokines, pourrait donc être un processus pro-épileptogène.

II.C. FOCALISATION SUR L'INFILTRATION DE MONOCYTES DERIVES DU SANG DANS LE PARENCHYME CEREBRAL

Les mécanismes impliqués dans le recrutement de leucocytes circulants du compartiment sanguin jusqu'au SNC sont actuellement encore méconnus. Le cerveau en souffrance émetterait des signaux qui attirent les leucocytes circulants. Parmi ces signaux, les molécules de la classe des chimiokines semblent être de bonnes candidates. Une fois au niveau du site d'émission des chimiokines, les leucocytes circulants doivent entrer dans le parenchyme cérébral. L'endothélium capillaire, la membrane basale, la matrice extracellulaire

proche des espaces périvasculaires et les prolongements astrocytaires et microgliaux sont autant d'obstacles à leur traversée.

II.C.1. Les chimiokines : Signature moléculaire de l'infiltration de monocytes dérivés du sang

Les chimiokines (pour cytokines chimiotactiques) représentent une superfamille de petites protéines (8 à 14 kDa), qui comprend une structure tertiaire très conservée malgré une identité de séquence relativement faible [294]. Les chimiokines contiennent toutes des motifs cystéine, ce qui les rend susceptibles d'interagir avec certains domaines transmembranaires de récepteurs couplés à des protéines G. La superfamille des chimiokines est divisée en 4 sous-groupes en fonction de l'organisation des résidus cystéine hautement conservés au niveau de l'extrémité N-terminal: la sous-famille CC qui comprend deux résidus cystéine juxtaposés, la sous-famille CXC qui comprend deux résidus cystéine espacés l'un de l'autre par un acide aminé, la sous-famille CX_3C (intervalle composé de 3 acides aminés) et enfin la sous-famille C qui comprend un seul résidu cystéine en position N-terminal [294]. Une sous-famille comprend plusieurs ligands et plusieurs récepteurs. Au sein d'une sous-famille, chaque récepteur a une affinité relative pour plusieurs ligands de la même sous-famille. Par exemple, le récepteur de type 5 de la sous-famille CC, nommé CCR5, est stimulé par les ligands de type 3, 4, 5 et 8 de la même sous-famille, respectivement nommés CCL3, CCL4, CCL5 et CCL8 [294]. Approximativement, environ 50 chimiokines humaines et murines et 18 récepteurs ont été identifiés [294]. Les chimiokines de la sous-famille CC joueraient un rôle essentiel dans le recrutement des monocytes/macrophages et des lymphocytes T [39,294].

Notre compréhension de l'implication des chimiokines aussi bien dans l'homéostasie cérébrale que dans les conditions pathologiques est encore faible. La liaison de la chimiokine CCL2, également appelé MCP-1 (pour *Monocyte Chemoattractant protein-1*), avec le récepteur CCR2 induit une transmigration efficace des monocytes/ macrophages au travers d'une monocouche de cellules endothéliales isolées à partir du cerveau [294]. Toutefois, l'extrapolation de ces données à la situation *in vivo* est dangereuse, car l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs est dérégulée lors de la préparation des cultures à partir de cellules isolées du SNC [294]. Les animaux soumis à une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (modèles d'étude des maladies auto-immunes du SNC telles que la sclérose en plaques) constituent de bons outils pour étudier l'influence des chimiokines sur la progression et la sévérité des processus immuno-pathologiques. Chez ces animaux, les cellules immunocompétentes (en particulier les monocytes/ macrophages et les lymphocytes T) pénétrent dans le parenchyme cérébral et attaquent les oligodendrocytes, ce

qui provoquent secondairement la mort des neurones les plus vulnérables. Les cellules immunocompétentes s'accumulent dans un premier temps au niveau des espaces périvasculaires, avant leur infiltration dans le parenchyme cérébral. L'expression des gènes des chimiokines CCL3, CCL4, CCL5 (respectivement MIP-1α, MIP-1β et RANTES) et des récepteurs CCR1, CCR2 et CCR5 par les cellules périvasculaires et les cellules microgliales avoisinantes est rapidement augmentée [294]. Les astrocytes réactifs au niveau des sites lésionnels produisent quant à eux la chimiokine CCL2 (MCP-1) [294]. Par ailleurs, la sévérité des EAE est réduite et l'infiltration de monocytes/ macrophages est diminuée chez les souris mutantes qui n'expriment pas *CCR1* et *CCR2* [294]. L'injection d'un antagoniste de CCR1 (BX471) diminue également la sévérité des EAE [39]. Enfin, l'administration d'anticorps anti-CCL3/MIP-1α ou anti-CCL2/MCP-1 inhibe la progression de l'EAE [39]. **Ces résultats indiquent que les chimiokines sont impliquées dans le recrutement de cellules immunocompétentes vers le parenchyme cérébral**. Les leucocytes infiltrants produisent, à leur tour, certaines chimiokines telles que CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β) et CCL5 (RANTES) [294], ce qui pourrait entretenir le processus d'infiltration.

Les chimiokines produites par un tissu lésé se retrouvent du côté luminal de l'endothélium capillaire (voir paragraphe III.C.1 de l'historique scientifique). La liaison des chimiokines, exposées côté luminal, à leurs récepteurs membranaires présents à la surface des leucocytes circulants, contribue non seulement aux interactions faibles qui maintiennent les leucocytes contre l'endothélium lors de la phase de roulement, mais induit aussi l'expression des gènes d'intégrines impliquées dans un ancrage plus soutenu à l'endothélium capillaire. Les leucocytes traversent ensuite l'endothélium capillaire par diapédèse. Lors de leur progression vers le parenchyme cérébral, ils rencontrent une véritable barrière contre l'infiltration : la membrane basale. Ils doivent alors mettre en œuvre des mécanismes qui leur permettent non seulement de dégrader cette membrane basale mais aussi de migrer aisément dans l'environnement extracellulaire.

II.C.2. Mécanismes d'entrée dans le cerveau : rôles des protéases ?

La matrice extracellulaire (MEC) du SNC est composée de protéoglycanes, de glycoprotéines et d'acide hyaluronique [244]. Parmi les molécules clés de la protéolyse extracellulaire figure le système plasminogène/ plasmine. La plasmine est une sérine protéase extracellulaire, qui dégrade de nombreuses glycoprotéines extracellulaires telles que la laminine. Dans ce système, la pro-enzyme inactive, plasminogène est activée en enzyme active, la plasmine, par deux facteurs : l'activateur tissulaire du plasminogène tPA (pour *tissu plasminogen activator*) et l'activateur urokinase du plasminogène, uPA (pour *urokinase*

plasminogen activator). Bien que ce système ait été initialement identifié pour son rôle dans la cascade protéolytique de la fibrinolyse, il jouerait un tout autre rôle au niveau du SNC. En effet, une activité enzymatique spécifique au tPA, et non à l'uPA, a été détéctée chez la souris adulte dans l'hippocampe, dans l'hypothalamus et dans l'amygdale [246]. Dans l'hippocampe, cette activité est détéctée au niveau de CA3 et au niveau du GD [246]. Des augmentations non seulement de l'ARNm de tPA mais aussi de l'activité enzymatique de cette protéase ont été détectées dans l'hippocampe après un *SE* [228,290]. Les cellules microgliales activées seraient responsables de l'augmentation de production de tPA [290,291]. Par ailleurs, les souris transgéniques dont l'expression du gène du tPA a été invalidée sont résistantes à l'excitotoxicité induite par l'acide kaïnique [290], de même que les souris dont l'expression du gène du plasminogène a été invalidée [291]. **Ces résultats suggèrent fortement que le tPA et le système plasminogène/ plasmine contribue à la mort neuronale des populations les plus vulnérables au cours de l'épileptogenèse.**

Il est possible que cet effet soit étroitement lié au processus de recrutement des monocytes circulants dans le parenchyme cérébral. Dans le cerveau, la plasmine active en effet la chimiokine MCP-1 [262]. Une fois activée, cette chimiokine exerce un chimiotactisme positif sur les monocytes (voir paragraphe II.C.1. de l'historique scientifique). Chez les souris dont l'expression du gène du tPA a été invalidée, la résistance des neurones « normalement » vulnérables est associée à une diminution de l'activation de la microglie [291], qui correspondrait à l'altération du processus de recrutement des monocytes circulants du fait de l'inactivité de MCP-1 (pas de clivage protéolytique par la plasmine). Chez les souris dont le gène du plasminogène a été invalidé, le processus de recutement de monocytes circulants est en effet diminué lors d'une réaction inflammatoire induite dans le péritoine [224]. **Au regard de ces résultats, il semblerait que le contingent de macrophages dérivés de monocytes circulants au sein de la population de cellules microgliales activées contribue à la mort neuronale au cours de l'épileptogenèse.**

Le rôle principal joué par le système plasminogène/ plasmine dans le processus de recrutement de monocytes serait alors l'activation de certaines chimiokines, plus que la dégradation de la membrane basale, pourtant nécessaire à l'infiltration des leucocytes. La famille des métalloprotéinases matricielles (MMP) constitue une autre classe de molécules susceptibles de remanier la MEC du SNC. Les MMP sont des protéases de la superfamille des metzincines, caractérisée par la présence de motifs hautement conservés au niveau du site catalytique qui permettent de lier un ion zinc (Zn^{2+}) [276]. Au moins 25 membres de la famille des MMP ont été identifiés chez les vertébrés [276]. Chaque MMP présente une

affinité spécifique pour un substrat extracellulaire, même si des redondances existent (***Tableau RBI***). La plupart des MMP sont secrétées sous une forme latente, et nécessitent une maturation par coupure protéolytique [276]. Certaines MMP sont impliquées dans la maturation d'autres MMP, et le système plasminogène/ plasmine peut également contribuer à cette cascade d'activation (***Figure RB6***).

Bien que les MMP semblent importantes pour l'infiltration de monocytes dans l'inflammation périphérique, elles ont été relativement peu étudiées dans les pathologies du SNC. Dans l'hippocampe de rat, les neurones pyramidaux des champs CA1 et CA3, ainsi que les neurones granulaires du GD, synthétisent la MMP-9, alors que la source principale de la MMP-2 serait la glie [279]. A la suite d'un *SE* induit par l'acide kaïnique, une synthèse accrue de MMP-9 active s'opère dans les couches granulaires et moléculaires du GD [279], mais le rôle de cette sur-production est encore inconnu. Il est possible que les cellules responsables de cette sur-production dans les couches du GD soient les cellules immunocompétentes qui ont infiltré le parenchyme. En effet, l'invalidation de l'expression du gène de cette enzyme chez les souris provoque une diminution de la taille de l'infarct lorsque celles-ci sont soumises à une ischémie expérimentale [86]. Le même effet est retrouvé chez les souris dont l'expression du gène de la MMP-9 a été invalidée uniquement dans les leucocytes circulants [86], associé à une réduction non seulement de la dégradation du collagène IV (un des substrats de cette enzyme) qui entoure les vaisseaux sanguins mais aussi de l'infiltration de leucocytes [86]. **Ces résultats suggèrent fortement que l'infiltration de leucocytes dans le cerveau nécessite que ces derniers synthétisent la MMP-9 dans le but de dégrader la membrane basale, et que ce processus se révèle toxique pour le tissu.**

Les protéases extracellulaires seraient impliquées dans l'infiltration de leucocytes dans le parenchyme cérébral. Le système plasminogène/ plasmine activerait les signaux qui exerce un chimiotactisme positif et les MMP, en particulier la MMP-9, dégraderaient certaines glycoprotéines de la membrane basale. Néanmoins, l'environnement extracellulaire du cerveau est sensiblement différent de celui des autres tissus dans la mesure où il contient moins de collagènes, de fibronectines ou de laminines mais plus de protéoglycanes. Il est alors envisageable que la dégradation des chaînes de sulfate d'héparane, constituants des protéoglycanes, soit un processus essentiel à l'infiltration de leucocytes dans le parenchyme cérébral.

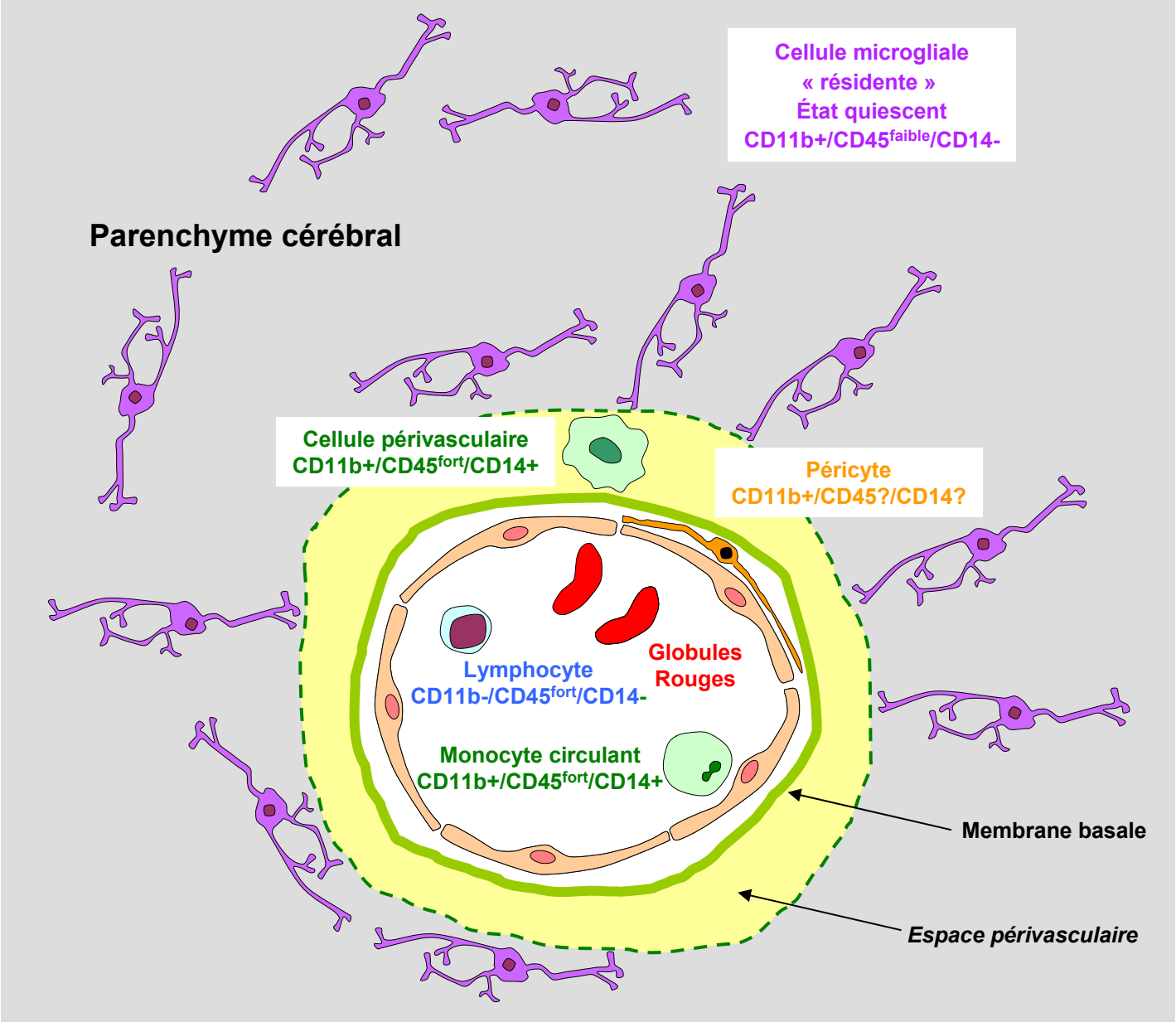


Figure RB4 : Phénotype des cellules immunocompétentes

Dans le cerveau, il existe plusieurs populations de cellules immunocompétentes qui expriment le gène du CD11b et présentent cette protéine à leur surface : les péricytes, les cellules périvasculaires et les cellules microgliales résidentes. CD11b est un marqueur de cellules myéloïdes qui correspond au récepteur de la molécule du complément C3b. Il ne permet pas de distinguer les différentes populations de cellules immunocompétentes du cerveau (en particulier, les cellules périvasculaires des cellules microgliales résidentes). CD45 est un marqueur de cellules hématopoïétiques (lignées myéloïde et lymphoïde) qui est fortement représenté à la surface des monocytes circulants, des cellules périvasculaires et des lymphocytes (T et B) (CD45^{fort}) et faiblement représenté à la surface des cellules microgliales résidentes (CD45f^{aible}). Ce marqueur est utilisé en cytomètrie de flux pour séparer les cellules microgliales résidentes des autres catégories de cellules immunocompétentes. CD14 est présenté à la surface des monocytes circulants et des macrophages tissulaires, et correspond au récepteur des lipopolysaccharides (LPS). Dans le cerveau, les cellules microgliales résidentes ne synthétisent pas CD14. Ce marqueur peut donc être utilisé pour discriminer les cellules microgliales résidentes des autres catégories de cellules immunocompétentes. Par ailleurs, les macrophages des leptoméninges non illustrés sur ce schéma sont également CD11b+/CD45^{fort}/CD14+ comme les cellules périvasculaires. En revanche, les lymphocytes sont CD11b-/CD45^{fort}/CD14-. Les péricytes sont parfois associés aux cellules périvasculaires, si bien qu'il est difficile d'établir clairement le phénotype de ces cellules.

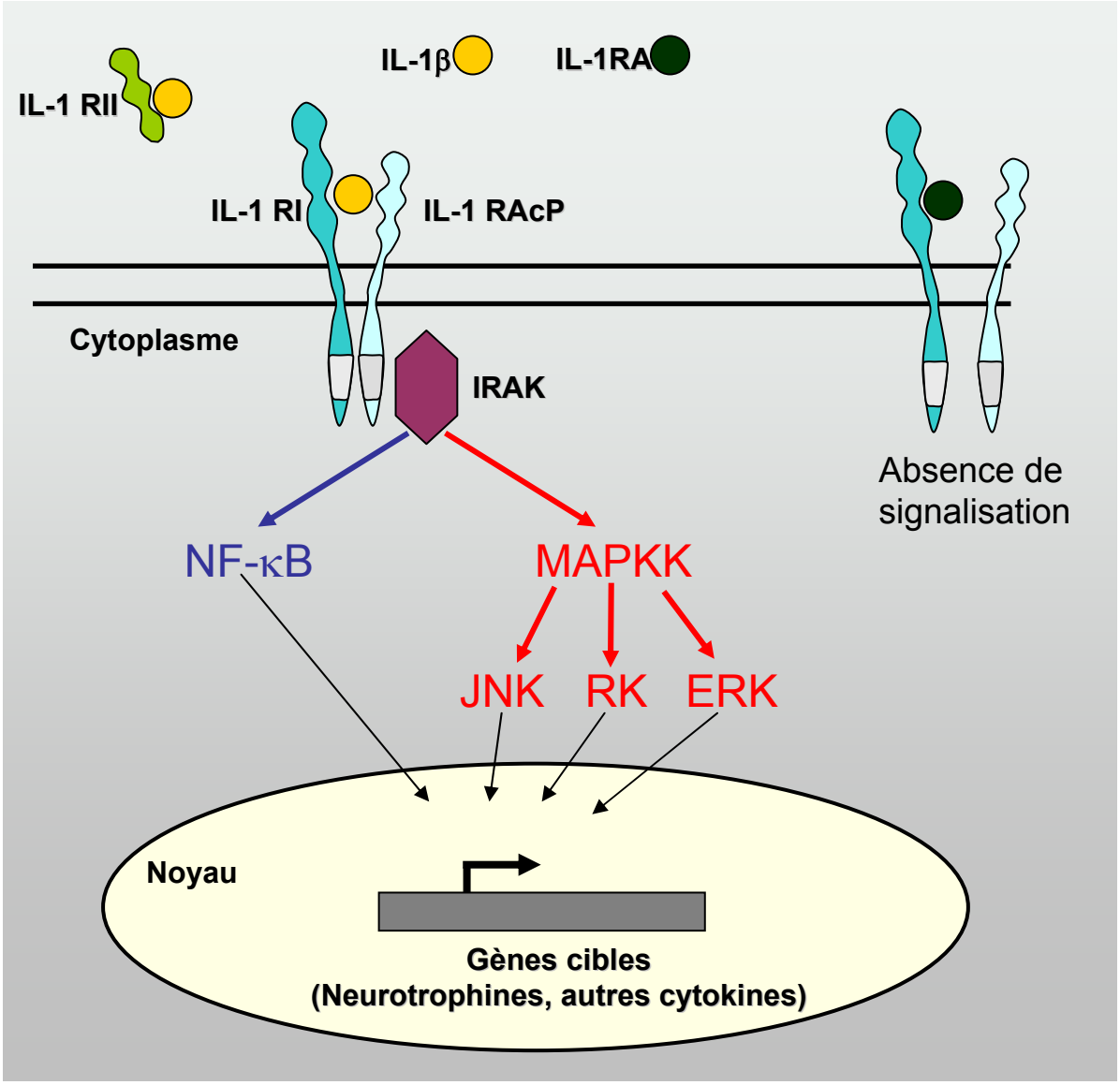


Figure RB5 : Le système IL-1

Cette cytokine est représentée dans le milieu extracellulaire sous sa forme IL-1β. Elle est capable de se lier avec deux types de récepteurs, le récepteur de type I (IL-1 RI) et le récepteur de type II (IL-1 RII). Seul IL-1 RI, complexé avec une protéine accessoire, IL-1 RAcP (**IL-1** **R**eceptor **Ac**cessory **P**rotein), est capable de transduire une signalisation intracellulaire, en recrutant une sérine/thréonine kinase, IRAK (**I**L-1 **R**eceptor-**A**ssociated **K**inase). Le récepteur soluble, IL-1 RII, est un récepteur leurre, qui capture l'IL-1 sans provoquer d'effets biologiques. En outre, IL-1 possède un antagoniste endogène, IL-1 Ra, qui a la capacité de se lier uniquement avec IL-1 RI. Une fois recrutée, IRAK va engendrer une cascade de phosphorylations, qui conduit à activer le complexe IKK (IκB Kinase) et diverses MAPKK (**M**itogen-**a**ctivated **P**rotein **K**inase **K**inase) :

- L'activation du complexe IKK permet d'activer à son tour le facteur de transcription NF-κB qui migre alors dans le noyau, où il active l'expression des gènes qui possèdent la séquence de liaison à NF-κB dans la région de régulation de l'activité de leur promoteur .
- L'activation des MAPKK entraîne la phosphorylation de trois MAPK (MAP Kinases) : ERK (**E**xtracellular **R**egulated **K**inases), JNK (**jun**-**k**inases) et RK (**R**eactivating **K**inase), qui conduisent également à activer la transcription de nombreux gènes.

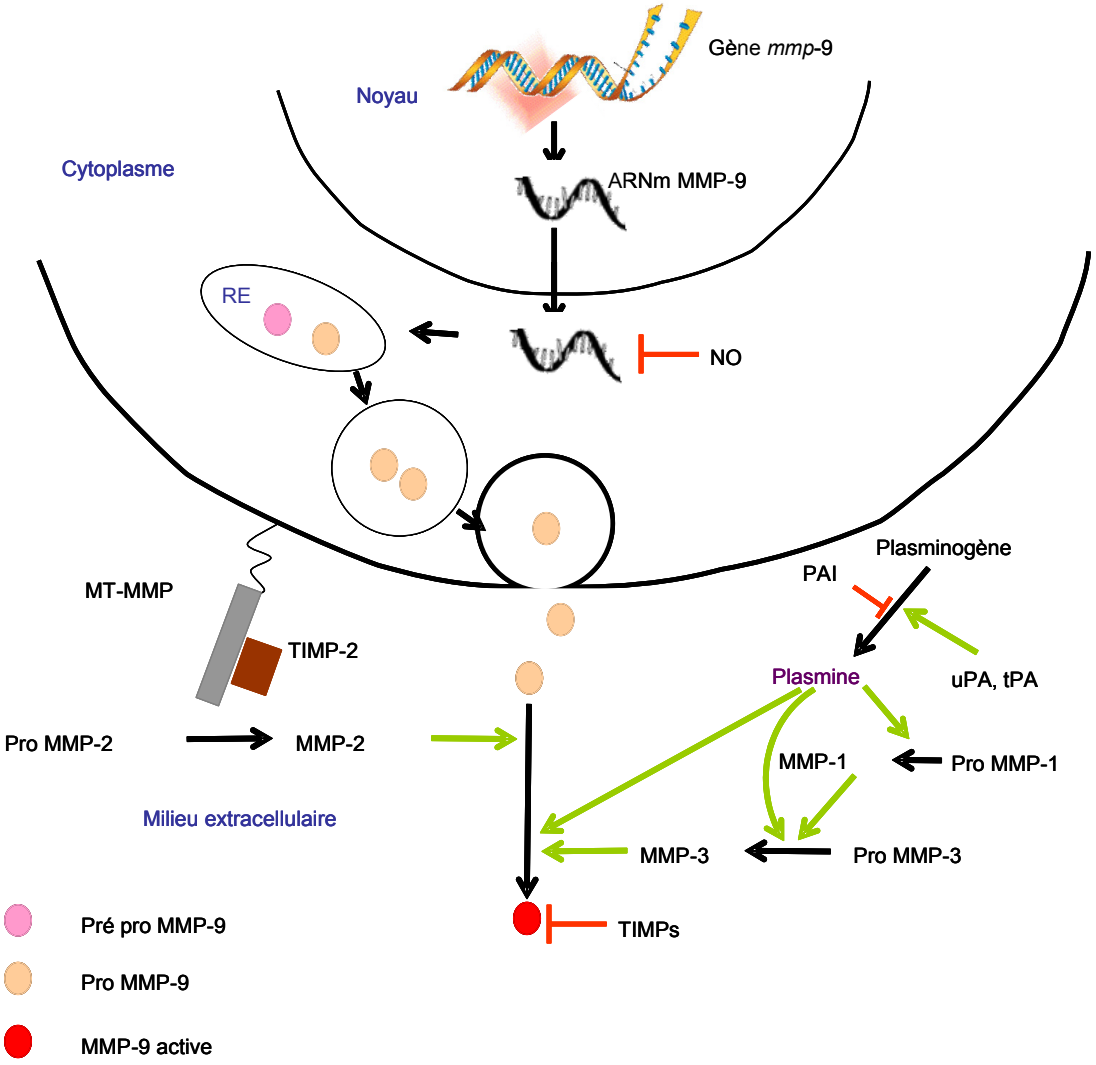


Figure RB6 : Interaction du système plasminogène/ plasmine et des métalloprotéinases : exemple de la métalloprotéinase 9

La synthèse de métalloprotéinase 9 (MMP-9) présente différents niveaux de régulation. Le gène mmp9 est transcrit en ARNm dont la stabilité dans le cytoplasme est inhibée par l'oxyde nitrique (NO). L'ARNm est traduit en une pré-pro-MMP-9 qui est sécrétée dans l'environnement extracellulaire sous forme inactive pro-MMP-9. L'activation de la MMP-9 par coupure protéolytique fait intervenir une cascade d'activation enzymatique. En effet, la plasmine active non seulement directement la MMP-9, mais active également la métalloprotéinase-1 (MMP-1) et la métalloprotéinase-3 (MMP-3). Cette dernière active directement la MMP-9. La plasmine dérive d'un précurseur inactif , le plasminogène, et est activée par deux sérine protéases : l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), et l'activateur urokinase du plasminogène (uPA). Ils existent par ailleurs plusieurs inhibiteurs de ces activateurs (PAI). Une autre métalloprotéinase est impliquée dans l'activation de MMP-9 : la métalloprotéinase-2 (MMP-2), elle-même activée par une métalloprotéinase de membrane. Enfin, il existe plusieurs inhibiteurs tissulaires de l'activité enzymatique de MMP-9 (TIMPs).

Abréviations : MMP, métalloprotéinase; MT-MMP, métalloprotéinase de type membranaire; TIMP, inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases; RE, reticulum endoplasmique; tPA, activateur tissulaire du plasminogène; uPA, activateur urokinase du plasminogène (uPA); PAI, inhibiteurs des activateurs du plasminogène.

La Famille des MMPs

		Substrats préférentiels
Collagénases		
Collagénase Interstitielle	MMP-1	Collagène Fibrillaire
Collagénase Neutrophile	MMP-8	
Collagénase 3	MMP-13	
Gélatinases		
Gélatinase A	MMP-2	Gélatine Collagène IV et V Fibronectine
Gélatinase B	MMP-9	
Stromelysines		
Stromelysine 1	MMP-3	Pro-collagène Collagénases Fibronectine Laminine Vitronectine Protéoglycanes
Stromelysine 2	MMP-10	
Stromelysine 3	MMP-11	
Metallo-élastase	MMP-12	
Matrilysine	MMP-7	
Membrane type		
MT 1 - MMP	MMP-14	Laminine Tenascine Fibrine MMPs
MT 2 - MMP	MMP-15	
MT 3 - MMP	MMP-16	
MT 4 - MMP	MMP-17	

Tableau RB1 : La famille des métalloprotéinases (MMP) et leurs substrats préférentiels

Ce tableau récapitule les différents noms donnés aux protéases de la famille des MMP et indique les substrats préférentiels.

Abréviations : MMP, métalloprotéinases ; MT-MMP, métalloprotéinases de type membranaire.

III. Le substrat de l'héparanase : les chaînes de sulfate d'héparnae

Chez les mammifères, les chaînes de sulfate d'héparane (HS) sont abondamment présentes à la surface des cellules, dans les membranes basales et dans l'environnement extracellulaire [24,125,142,256,287]. Ces chaînes présentent une très grande diversité structurelle sur laquelle reposent de nombreuses activités biologiques qu'elles modulent. Dans le cerveau, l'environnement extracellulaire représente environ 30 % du volume total. De plus, dans certaines situations physiologiques ou pathologiques, la nature et la composition de cet environnement extracellulaire peuvent être modifiées.

III.A. PRESENTATION RAPIDE DES CHAINES DE SULFATE D'HEPARANE

III.A.1. Chaînes de sulfate d'héparane et classification

Les chaînes d'HS sont des chaînes linéaires de polysaccharides que l'on appelle de façon générale les glycosaminoglycanes (GAG). Ces chaînes sont généralement liées de façon covalente aux résidus sérine de courts peptides ou polypeptides, que l'on appelle le squelette protéique [142], on parle alors de protéoglycanes (PG) (***Figure RB7***). La classification des différentes familles de PG repose sur la nature des chaînes de GAG que portent les squelettes protéiques (***Tableau RBII***).

Les chaînes d' HS sont constituées d'unités disaccharidiques *[acide uronique-D glucosamine*] répétées. La taille d'une chaîne d'HS varie généralement de 50 à 200 unités disaccharidiques (environ 25-100 kDa) [24,167]. Les GAG sont particulièrement représentés dans le cerveau, où les chaînes de sulfate de chondroïtine (CS), les chaînes d'HS et l'acide hyaluronique sont retrouvés en abondance [168]. Toutefois, des chaînes de sulfate de kératane et de sulfate de dermatane (DS) sont également retrouvées dans le cerveau [47,72,85,231].

III.A.2. Le squelette protéique

La grande diversité des PG, qui est déjà assurée par la nature des GAG qui les composent, est renforcée par l'existence de plusieurs types de squelette protéique. Par exemple, il existerait au moins 25 squelettes protéiques différents dans le cerveau de rat adulte [110]. En ce qui concerne les HSPG, trois sous-groupes ont été principalement définis en fonction de la nature du squelette protéique associé (***Figure RB8***):

- Les glypicanes, dont le squelette protéique d'environ 60 kDa en moyenne est ancré à la face extracellulaire de la membrane plasmique via une ancre Glycosyl-Phosphatidyl Inositol (GPI),
- Les syndécanes, dont le squelette protéique d'environ 30 kDa en moyenne est transmembranaire,
- Le perlécane, squelette protéique d'environ 460 kDa et l'agrine, squelette protéique d'environ 200 kDa sont généralement sécrétées ou liées à des composantes des membranes basales.

Les glypicanes et les syndécanes peuvent également exister sous forme libre dans la matrice extracellulaire (MEC) après coupure protéolytique de leurs formes membranaires respectives. Les squelettes protéiques ainsi libérés dans la MEC et les squelettes protéiques de type perlecane et agrine peuvent se lier de façon non covalente à l'acide hyaluronique (***Tableau RBII***), formant des agrégats moléculaires dans lesquels les protéines fibreuses de la MEC de type collagène peuvent s'insérer. Par ailleurs, certains squelettes protéiques peuvent porter plusieurs types de chaînes de GAGs, tels que la famille des syndécanes qui portent majoritairement des chaînes d'HS mais aussi quelques chaînes de CS et de DS. En revanche, la famille des glypicanes porte exclusivement des chaînes d'HS [257].

C'est l'expression tissu spécifique des squelettes protéiques qui portent les chaînes d'HS qui détermine la présence tissu spécifique des HSPG [217] (***Tableau RBIII***). Cette expression peut également être différente au sein des diverses populations cellulaires qui constituent ce tissu [298]. Par exemple, les chaînes d'héparine et d'HS ont une structure relativement proche (***Tableau RBII***) mais ne sont pas liées au même type de squelette protéique. Ainsi, les chaînes d'héparine ne sont pas distribuées dans le cerveau, car le type de squelette protéique auxquelles elles sont liées n'est pas synthétisé dans le cerveau, contrairement aux chaînes d'HS. En particulier, le glypicane 2 possède un squelette protéique qui n'est produit qu'au sein du SNC, si bien que cette molécule est également appelée « cérébroglycane ».

Par ailleurs, les domaines cytoplasmiques des syndécanes sont très conservés. Ils peuvent lier des ligands intracellulaires tels que certaines kinases ou encore des protéines du cytosquelette. Les syndécanes interviendraient ainsi dans différentes voies de signalisation grâce à leur queue cytoplasmique. Dans le milieu extracellulaire, la plupart des fonctions attribuées aux syndécanes concerne les chaînes d'HS plutôt que le squelette protéique [98]. Enfin, des domaines situés sur le « squelette » protéique du perlecane possèdent la capacité de

se lier avec des protéines matricielles de structure telles que certaines laminines contribuant ainsi à l'architecture en réseau de mailles de la MEC.

III.A.3. Les chaînes de sulfate d'héparane

La synthèse des chaînes d'HS est un enchaînement d'événements moléculaires qui dépend de différentes enzymes. On peut toutefois décomposer les événements en plusieurs étapes (***Figures RB9 et RB10***):

III.A.3.a. Initiation de la chaîne :

Cette étape débute par le transfert enzymatique du xylose sur le groupe hydroxyle d'un résidu sérine du squelette protéique juxtaposé à un résidu glycine, situé en position C-terminal par rapport à la sérine. Le nombre de résidus sérine « accepteur du xylose » varie en fonction de la séquence peptidique du squelette protéique. Généralement, un squelette protéique présente entre 2 et 4 sites d'attachements. Une fois le xylose fixé, des enzymes de l'appareil de Golgi transfèrent successivement à sa suite deux molécules de galactose et une molécule d'acide glucuronique (GlcA) pour former le tétrasaccharide de liaison. Ce tétrasaccharide non-sulfaté permet l'amorçage de la polymérisation de la chaîne. L'acide glucuronique est formé à partir du glucose par conversion enzymatique due à une glucose-deshydrogénase.

III.A.3.b. Polymérisation de la chaîne :

Cette réaction est catalysée par l'HS polymérase et repose sur un ajout alternatif, à partir du tétrasaccharide de liaison, de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et de GlcA. La purification partielle de cette enzyme a permis de révéler qu'elle était identique à EXT-2, un membre de la famille EXT, identifié chez la drosophile. Des mutations au niveau d'un membre de cette famille sont associées à des exostoses multiples héréditaires; pathologies généralement caractérisées par une dysplasie osseuse. Un autre membre de cette famille EXT-1 possède des activités catalytiques similaires à EXT-2 [159].

III.A.3.c. Modifications séquentielles :

La première modification susceptible d'avoir lieu est un remplacement du groupement acétyl par un groupement sulfate au niveau du résidu glucosamine (GlcN), ce qui implique une enzyme nommée N-désacétylase/N-sulfotransférase (NDST), dont il existe chez l'homme 4 isoformes [102]. Puis le résidu GlcA peut subir une épimérisation par la glucuronyl-C5-épimérase pour former un acide iduronique (IdoA), dont il n'existe chez l'homme qu'une seule isoforme [102]. Ensuite, les différentes unités disaccharidiques qui composent la chaîne d'HS sont susceptibles de subir diverses sulfatations. En effet, un groupement sulfate SO_3^- peut être ajouté en position 2-O des résidus GlcA ou IdoA par une 2-O-sulfotransférase (2-

OST), dont il existe chez l'homme qu'une seule isoforme, ou en positions 3-O et 6-O du résidu GlcN par une 3-O sulfotransférase (3-OST) et une 6-O sulfotransférase (6-OST) dont il existe chez l'homme respectivement 5 et 3 isoformes [102]. Toutes ces enzymes ne modifient pas la taille de la chaîne mais engendrent une forte diversité de séquences osidiques possibles au sein de la chaîne [217] (***Figure RB10***). Il existe 48 unités dissaccharidiques possibles pour constituer la longue chaîne d'HS grâce à ces modifications séquentielles [209].

La synthèse de certaines isoformes des enzymes de biosynthèse serait spécifique d'un contexte biologique précis ou d'un type cellulaire particulier. Par exemple, l'isoforme 2 de la NDST est présente dans le tube neural de la souris jusqu'au 10ème jour du développement embryonnaire (E10) alors qu'à partir de E12, c'est l'isoforme 1 qui prend le relai [102]. L'isoforme 2 de la NDST permettrait une N-sulfatation plus efficace que l'isoforme 1 [160], ce qui suggère alors que la pluralité des isoformes des enzymes de biosynthèse des chaînes d'HS participerait à la grande diversité structurelle de ces dernières. En particulier, le taux de sulfatation varie énormément le long de la chaîne d'HS et les sulfatations apparaissent concentrées dans des disaccharides juxtaposés. Ceci génèrent des domaines fortement sulfatés « HSD » (pour *Highly Sulfated Domain*) qui contrastent avec des domaines peu ou pas modifiés « UMD » (pour *UnModified Domain*) [160]. Les domaines « HSD » sont constitués de 10 à 16 unités disaccharidiques fortement modifiées, riches en IdoA et très sulfatés aussi bien au niveau du résidu IdoA que le résidu GlcN. Les domaines « UMD » apparaissent plus longs et beaucoup moins modifiés.

La régulation des mécanismes de modifications qui permettent une alternance reproductible des domaines « UMD » et « HSD » le long de la chaîne d'HS dans différents tissus n'est à ce jour pas encore élucidée. Toutefois, ces mécanismes de modifications doivent être finement régulés étant donné que les chaînes d'HS isolées à partir de cortex cérébral humain ne présentent aucune distinction dans leur composition d'un individu à un autre. En revanche, la composition des chaînes d'HS diffère au sein d'un même individu entre les différents tissus qui le composent, puisque les chaînes dans le cerveau sont différentes de celles des autres organes (foie, aorte, rein) [160]. Par ailleurs, la distribution des modifications au sein des chaînes d'HS peut changer en fonction du stade développemental, de l'âge ou encore de l'évolution de certaines pathologies. Par exemple, la différenciation des précurseurs neuronaux en neurones matures est accompagnée d'altérations dans la distribution des O-sulfatations au sein des chaînes d'HS [229].

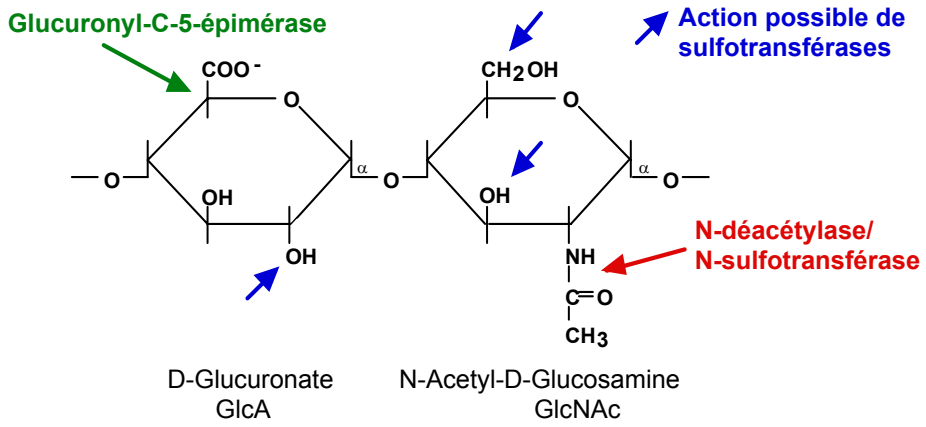


Figure RB10 : *Modifications enzymatiques du motif de base des chaînes de sulfate d'héparane.*

Dans l'appareil de Golgi, les chaînes subissent des modifications séquentielles : désacétylations, sulfatations, épimérisations. Ces modifications ne touchent que certaines régions des molécules : la N-désacétylase/N-sulfotransférase modifie des groupes de résidus GlcNAc. Les résidus D-GlcA adjacents aux résidus $GlcNSO_3$ peuvent ensuite être épimérisés en acide L-iduronique et subir des o-sulfatations en position 2 du cycle pyranose.

III.B. PROPRIETES ATTRIBUEES AUX CHAINES DE SULFATE D'HEPARANE

III.B.1. Contrôle de la viscosité de la matrice extracellulaire

La régulation des concentrations extracellulaires en HSPG et plus particulièrement en chaînes d'HS participerait activement au contrôle de la viscosité de la MEC. En effet, l'enrichissement extracellulaire en HSPG dans le cerveau rend la matrice très visqueuse. Ceci est dû à la forte densité de charges négatives retrouvée le long des chaînes d'HS, qui force la molécule à adopter une conformation allongée pour minimiser les forces répulsives entre les groupements voisins [167]. Cette augmentation de la viscosité oppose une résistance

mécanique à tout mouvement de migration, et en particulier à toute motilité cellulaire au sein de l'environnement extracellulaire.

Les mécanismes régulateurs de la concentration extracellulaire en chaînes d'HS englobent aussi bien les processus de biosynthèse de ces dernières, contrôlés par une série d'enzymes, que les processus de dégradation, faisant intervenir principalement l'héparanase (voir chapitre IV de l'historique scientifique). Compte tenu de l'architecture de la MEC du SNC, où les chaînes d'HS constituent des maillons importants, reliant les glycoprotéines aux longues chaînes d'acide hyaluronique, il est tout à fait vraisemblable qu'une moindre représentativité extracellulaire de ces chaînes entraîne un désassemblage de ces constituants et une fluidification propice aux remaniements morphologiques.

III.B.2. Liaison à des protéines extracellulaires qui présentent un domaine de fixation aux chaînes de sulfate d'héparane

Une des conséquences fonctionnelles de la grande hétérogénéité structurelle des chaînes d'HS est la capacité de ces dernières de se lier à des protéines extracellulaires et d'interagir avec elles. Ces dernières présentent des sites d'interaction avec des protéines de structure, telles la fibronectine, des cytokines telles que l'interleukine-8, des facteurs de croissance tels que les FGF-1, FGF-2 et le facteur de croissance des hépatocytes (HGF pour « hepatocyte growth factor ») ainsi que des enzymes telles que la lipoprotéine lipase et l'héparanase [146,229]. La liaison de certaines protéines avec les chaînes d'HS dépend d'interactions ioniques. Ces interactions sont favorisées dans les domaines « HSD » riches en IdoA et en groupements sulfate[229]. L'existence de sites de liaison dans les « HSD » qui seraient spécifiques/ sélectifs de certaines protéines est encore matière à débats [146].

Différentes fonctions ont été attribuées aux chaînes d'HS selon leur localisation. Les chaînes d'HS relativement éloignées de la surface cellulaire dans l'environnement extracellulaire, vraisemblablement portées par des « squelettes » protéiques de type perlecane et agrine ou encore par des glypicanes et syndécanes coupés, serviraient de réservoir en molécules bioactives. Les chaînes d'HS de la surface cellulaire, portées par des syndécanes ou des glypicanes, serviraient de co-récepteurs (ce qui modulerait ainsi la liaison de certains ligands avec leurs récepteurs) ou de récepteurs (ce qui faciliterait l'internalisation de leurs ligands).

III.B.2.a. Chaînes de sulfate d'héparane : réservoir extracellulaire en facteurs actifs et contrôle de leur biodisponibilité extracellulaire.

Lorsque les protéines sont sécrétées, elles vont diffuser dans l'environnement proche des cellules qui les synthétisent. Les protéines qui peuvent lier les chaînes d'HS vont se lier

non seulement à celles présentes au niveau de la surface cellulaire mais également à celles dispersées dans l'environnement extracellulaire. Une fois liés à ces chaînes, ces protéines sont protégées des dégradations par les protéases de la matrice [229]. Elles sont éloignées de leurs récepteurs membranaires. Ainsi, les chaînes d'HS de la MEC serviraient de réservoir de facteurs actifs. Une dégradation par l'héparanase (voir chapitre IV de l'historique scientifique) de ces chaînes matricielles libérerait rapidement ces facteurs, ce qui les rendrait disponibles pour une diffusion et une fixation à leurs récepteurs membranaires. Par ailleurs, la liaison de ces facteurs de proche en proche avec les chaînes d'HS matricielles favoriserait leur déplacement extracellulaire, augmentant de ce fait la distance de leur action paracrine [257].

III.B.2.b. Chaînes de sulfate d'héparane : co-récepteurs et modulateurs des voies de signalisation

En culture, les traitements qui entraînent une diminution des chaînes d'HS présentes à la surface de la cellule réduisent la signalisation des facteurs de la famille du FGF [230]. Des études crystallographiques ont révélé l'existence de domaines de liaison aux chaînes d'HS au niveau du complexe formé par le FGF-2 et le récepteur de type 1 (FGFR1) [24 ,257]. Les chaînes d'HS présentes à la surface de la cellule faciliteraient ainsi la rencontre de certains ligands avec leurs récepteurs. Les chaînes d'HS ne sont pas strictement requises pour la liaison du ligand avec son récepteur, mais elles potentialisent cette liaison, surtout lorsque le ligand est présent dans l'environnement extracellulaire à de faibles concentrations [24].

Des études génétiques réalisées chez la drosophile sont venues confortées cette notion. En effet, dans cette espèce, les lignées créées à partir de mutation de gènes impliqués dans la biosynthèse des chaînes d'HS démontrent que celles-ci sont des modulateurs importants des voies de signalisation de différents facteurs en général, et des morphogènes en particulier. Les morphogènes sont des molécules sécrétées qui, par action autocrine et paracrine, jouent un rôle important dans les communications intercellulaires, non seulement au cours du développement embryonnaire, mais également à l'âge adulte. Parmi les signaux modulés par les chaînes d'HS extracellulaires, on retrouve les membres des familles Wingless (Wg), Hedgehog, Transforming Growth Factor β (TGF-β) et FGF. Par exemple, une mutation du gène de la NDST, enzyme responsable des N-sulfatations, chez la drosophile génère un mutant nommé « sulfatless » dans lequel les voies de signalisation de Wg et FGF sont fortement altérées [257]. Chez la souris, une invalidation de l'isoforme 1 de la NDST indique que cette enzyme est nécessaire à la viabilité et au bon déroulement de la morphogenèse de nombreux tissus [257].

III.B.2.c. Chaînes de sulfate d'héparane : récepteurs pour une internalisation et un recyclage

Le renouvellement physiologique des chaînes d'HS portées par les glypicanes et les syndécanes passent par une internalisation, la formation de vésicules d'endocytose et une orientation de ces dernières vers les lysosomes. Dans les lysosomes, les enzymes de dégradation de ces chaînes, principalement l'héparanase (voir chapitre IV de l'historique scientifique), permettent une fragmentation efficace du polysaccharide en oligo et monosaccharides. Au cours de ce processus d'internalisation, les chaînes d'HS entraînent avec elles les facteurs qui leur étaient liés. En effet l'internalisation du FGF-2 par les syndécanes et les glypicanes est un mécanisme indépendant du récepteur du FGF. Les chaînes d'HS peuvent alors agir comme des récepteurs pour une internalisation et un recyclage dans les lysosomes des protéines auxquelles elles sont associées [24].

III.C. IMPLICATION DES CHAINES DE SULFATE D'HEPARANE DANS L'INFILTRATION DES LEUCOCYTES AU COURS DE L'INFLAMMATION

La phase aiguë de la réaction inflammatoire est caractérisée par une interaction entre les leucocytes du sang et les cellules endothéliales proches du site de l'inflammation, et par la production importante de cytokines pro-inflammatoires. Les chaînes d'HS joueraient un rôle dans ces processus, la spécificité de ce rôle étant liée à leur localisation extracellulaire.

III.C.1. Rôles d'adhérence des chaînes de sulfate d'héparane portées par les syndécanes et glypicanes des cellules endothéliales.

En culture, les cellules endothéliales présentent de nombreux HSPG à leur surface, ces HSPG étant aussi bien des syndécanes que des glypicanes [209]. Sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires, les cellules endothéliales augmentent la représentativité de certains HSPG, tels que le syndécane-1, à leur surface cellulaire [209]. Cette augmentation favorise au site d'inflammation la première étape de la traversée des leucocytes dans le tissu, c'est-à-dire le rapprochement et le roulement de ces derniers contre l'endothélium en dépit du flux sanguin. Deux mécanismes d'adhérence non jonctionelle des leucocytes à l'endothélium capillaire activé par les cytokines pro-inflammatoires en sont responsables (***Figure RB11***) :

- Tout d'abord, ces chaînes d'HS servent de ligand à la sélectine L, une glycoprotéine de la famille des lectines produite de façon constitutive par les leucocytes.
- Dans un second temps, ces chaînes en liant les chimiokines interviennent dans l'adhérence provoquée par la fixation de ces chimiokines à leurs récepteurs membranaires présents à la surface des leucocytes.

Chez la souris, l'invalidation du gène de la NDST (enzyme qui participe à la création des domaines « HSD ») dans les cellules endothéliales provoque une altération du processus d'infiltration des neutrophiles au cours de l'inflammation périphérique [209,317], ce qui confirme que les domaines « HSD » des chaînes d'HS sont impliqués dans l'infiltration des leucocytes.

III.C.2. Les chaînes de sulfate d'héparane de la membrane basale des capillaires sanguins jouent un rôle de barrière physique à la diapédèse des leucocytes

La membrane basale sus-endothéliale représente une barrière physique d'environ 20 à 100 nm d'épaisseur à la pénétration des leucocytes. Cette membrane basale est riche en HSPG, et notamment en perlecane et en agrine. Les chaînes d'HS portées par ces squelettes protéiques participent activement à la structure en mailles de la MEC. De plus, ces chaînes constituent un réservoir important en facteurs actifs tels que les facteurs de croissance ou les cytokines. Pour pénétrer le tissu, les leucocytes doivent dégrader cette membrane basale et, pour ce faire, utilisent une batterie d'enzymes tels que les métalloprotéinases ou encore l'héparanase (voir chapitre IV de l'historique scientifique). La dégradation des chaînes d'HS par l'héparanase produit des oligosaccharides et libère les facteurs piégés qui peuvent moduler le comportement des leucocytes infiltrés (voir chapitre IV de l'historique scientifique) et amorce les processus d'angiogénèse. Par ailleurs, la surface cellulaire de nombreux leucocytes contient à l'état quiescent une faible quantité de divers HSPG. Au cours de leur activation, ces leucocytes augmentent et présentent à leur surface certains HSPG spécifiques. Par exemple, la différenciation des monocytes en macrophages est associée à une sur-expression des gènes des syndécanes 1, 2 et 4 [209]. Cette proportion augmentée de chaînes d'HS à leur surface pourrait faciliter la progression des leucocytes dans le tissu en fournissant des points d'ancrage à la MEC ou encore pourrait intervenir dans leur sensibilisation aux facteurs de l'environnement par la potentialisation de certaines voies de signalisation (voir paragraphe III.B.2.b de l'historique scientifique).

Une forte réaction inflammatoire contribuerait à amorcer l'épileptogenèse dans l'hippocampe. Notre hypothèse est que des monocytes/macrophages infiltrent l'hippocampe au cours de cette inflammation. Si tel était le cas, ces cellules auraient besoin de dégrader non seulement la membrane basale, mais aussi la MEC de l'hippocampe, très abondantes en chaînes d'HS. Chez les mammifères, ces chaînes sont dégradées spécifiquement par l'héparanase.

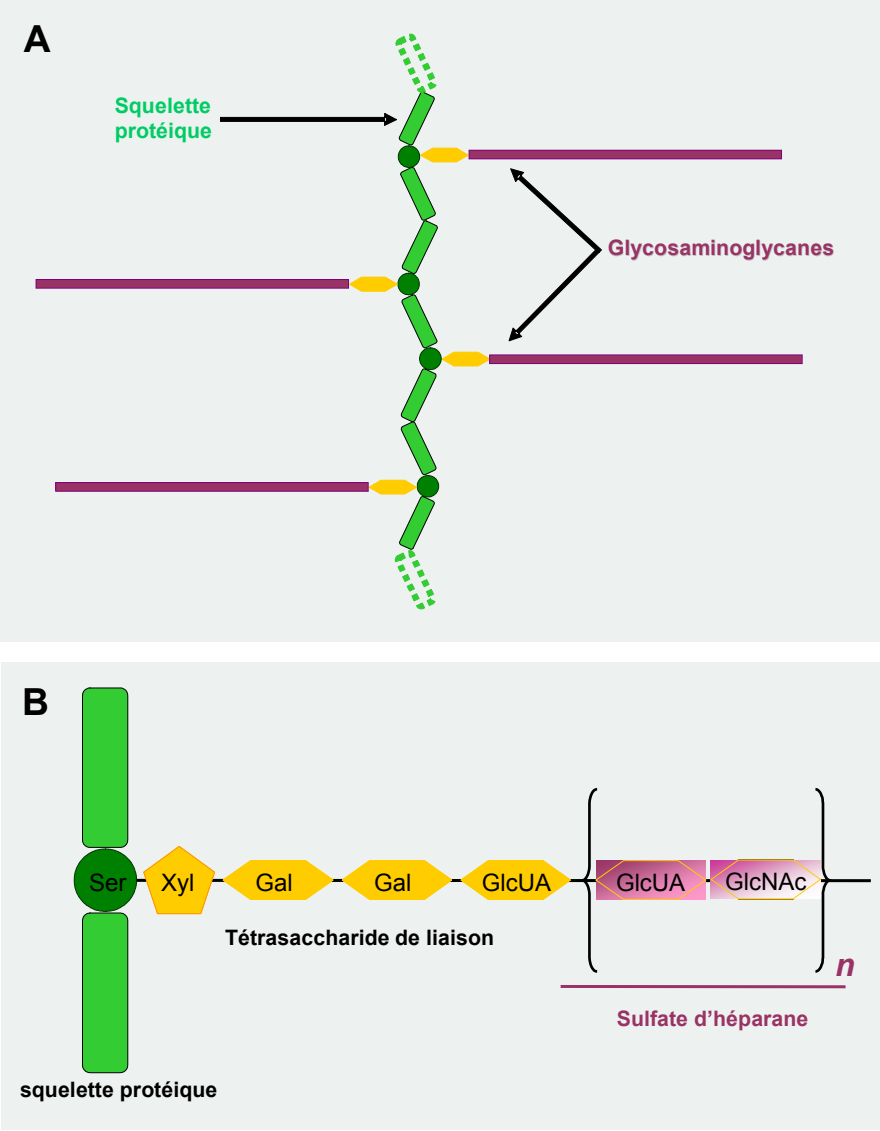


Figure RB7 : Organisation moléculaire d'un protéoglycane à sulfate d'héparane (HSPG)

A : Représentation schématique d'une molécule de protéoglycane (PG). Cette molécule résulte de l'association d'un squelette protéique avec des séquences osidiques.

B : Liaison d'une chaîne de sulfate d'héparine (HS) avec un squelette protéique. La synthèse enzymatique de la chaîne d'HS est engagée par une glycosyltransférase, qui transfère un résidu xylose (Xyl) sur un résidu sérine (Ser) du squelette protéique. Puis différentes glycosyltransférases golgiennes permettent la formation du tétrasaccharide de liaison qui amorce la synthèse de la chaîne polysaccharidique par l'HS polymérase. Cette synthèse repose sur un ajout alternatif d'acide glucuronique (GlcUA) et de N-acétyl-glucosamine (GlcNAc), qui constitue le motif disaccharidique répété *n* fois. Une fois assemblée, cette chaîne d'HS constitue l'élément de base, qui pourra être modifié par des épimérisations (transformant l'acide glucuronique en acide iduronique) et de nombreuses sulfatations.

Abréviations : « Ser » = sérine ; « Xyl » = xylose ; « Gal » = galactose ; « GlcUA » = acide glucuronique ; « GlcNAc » = N-acétyl-glucosamine.

Les différents glycosaminoglycanes

Glycosaminoglycanes	Masse moléculaire (kDa)	Disaccharide répété		Sulfates par unité disaccharidique	Sous-familles
		Monosaccharide A	Monosaccharide B		
Sulfate d'héparane	25-120	GlcA ou IdoA	GlcNAc ou GlcNS	0,2-3,0	HSPG
Héparine	50-250	GlcA ou IdoA	GlcNAc ou GlcNS	2,0-3,0	
Chondroïtine-4-sulfate	50-500	GlcA	N-acétyl-D-galactosamine	0,2-1,0	CSPG
Chondroïtine-6-sulfate	50-500	GlcA	N-acétyl-D-galactosamine	0,2-2,3	
Dermatane sulfate	150-400	GlcA ou IdoA	N-acétyl-D-galactosamine	1,0-2,0	DSPG
Kératane sulfate	40-190	D-galactose	GlcNAc	0,9-1,8	KSPG
Acide hyaluronique	40 à 80 000	GlcA	GlcNAc	0	Acide hyaluronique

Tableau RBII : Caractéristiques biochimiques des glycosaminoglycanes (GAG)

La classification des sous-familles de PG est basée sur la nature des GAG qu'ils portent. Les unités disaccharidiques qui composent les chaînes de GAG sont indiquées, ainsi que le taux de sulfatation. Le disaccharide répété est le même dans les chaînes d'héparine et de sulfate d'héparane (HS). Toutefois, dans les chaînes d'héparine, le taux en sulfate est plus important et l'acide L-iduronique est plus représenté que dans les chaînes d'HS. En fonction des chaînes de GAG, on distingue quatre sous familles de PG sont représentées. L'acide hyaluronique est un long glycosaminoglycane particulier dans le sens où il n'est jamais lié à un squelette protéique.

Abréviations : HSPG, protéoglycanes à sulfate d'héparane ; CSPG, proteoglycanes à sulfate de chondroïtine; DSPG, proteglycanes à sulfate de dermatane; KSPG, proteoglycanes à sulfate de kératane; GlcA, acide D-glucuronique ; GlcNAc, N-acétyl-D-glucosamine ; GlcNS, N-sulfate-D-glucosamine ; .IdoA, acide L iduronique : HS, sulfate d'héparane.

Les principaux squelettes protéiques

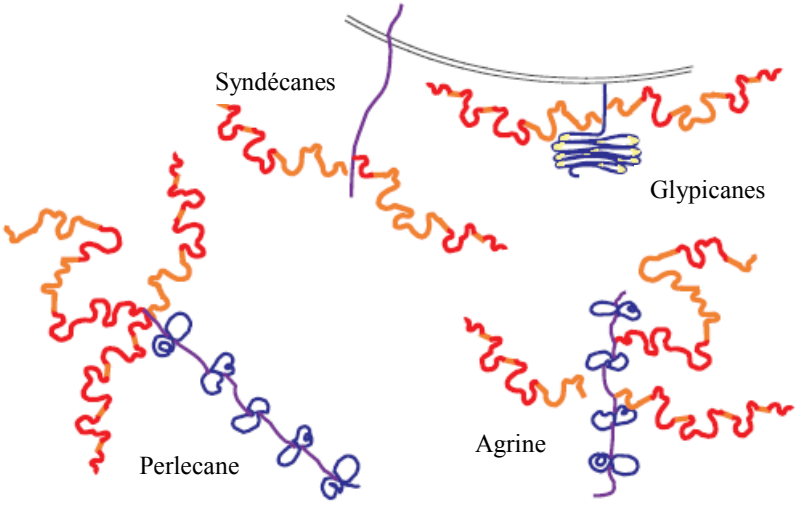


Figure RB8 : Diversité des squelettes protéiques portant les chaînes d'HS

Les familles de squelettes protéiques de type syndécanes et glypicanes sont liées à la membrane plasmique des cellules, respectivement par un domaine transmembranaire ou une ancre glycosyl phospatidylinositol (GPI). Les résidus sérine servant de sites d'attachement des chaînes d'HS sont situés dans la partie distale des syndécanes par rapport à la membrane plasmique et au niveau adjacent à celle-ci concernant les glypicanes. Chez les mammifères, au moins 4 syndécanes et 6 glypicanes, dont les squelettes protéiques sont portés par des gènes différents, ont été identifiés. Les chaînes d'HS portées par les syndécanes et les glypicanes sont donc localisées à la surface de la cellule, bien que ces squelettes protéiques puissent être clivés par des protéases et libérés dans l'environnement extracellulaire. Dans la MEC et les membranes basales, on retrouve les squelettes protéiques de tailles plus conséquentes de type perlecane et agrine. Il existe de multiples isoformes de ces deux protéines aux domaines globulaires. Généralement, le perlecane et l'agrine portent les chaînes d'HS principalement dans leurs domaines N terminaux. D'après la revue de *Perrimon et Bernfield, 2000 [218]*

Protéoglycanes	**Autre Nom**	**Distribution tissulaire**	
		Stade embryonaire	**Âge adulte**
Syndécane-1	Syndécane	Nombreux organes	Epithélium, plasmocytes
Syndécane-2	Fibroglycane	Nombreux organes	Endothélium, fibroblastes
Syndécane-3	N-syndécane	Neuro-ectoderme	SNC
Syndécane-4	Amphiglycane	Ubiquitaire	Ubiquitaire
Glypicane-1	Glypicane	SNC	Ubiquitaire
Glypicane-2	Cérébroglycane	SNC	?
Glycipane-3	OCI-5	Ubiquitaire	SNC
Glypicane-4	K-glypicane	Rein, SNC, glandes	SNC
Glypicane-5		Rein, membres, SNC	
Glypicane-6			

Tableau RBIII : Distribution tissulaire des syndécanes et des glypicanes. La liste des organes cités est non-exhaustive.

Abréviation : SNC, système nerveux central.

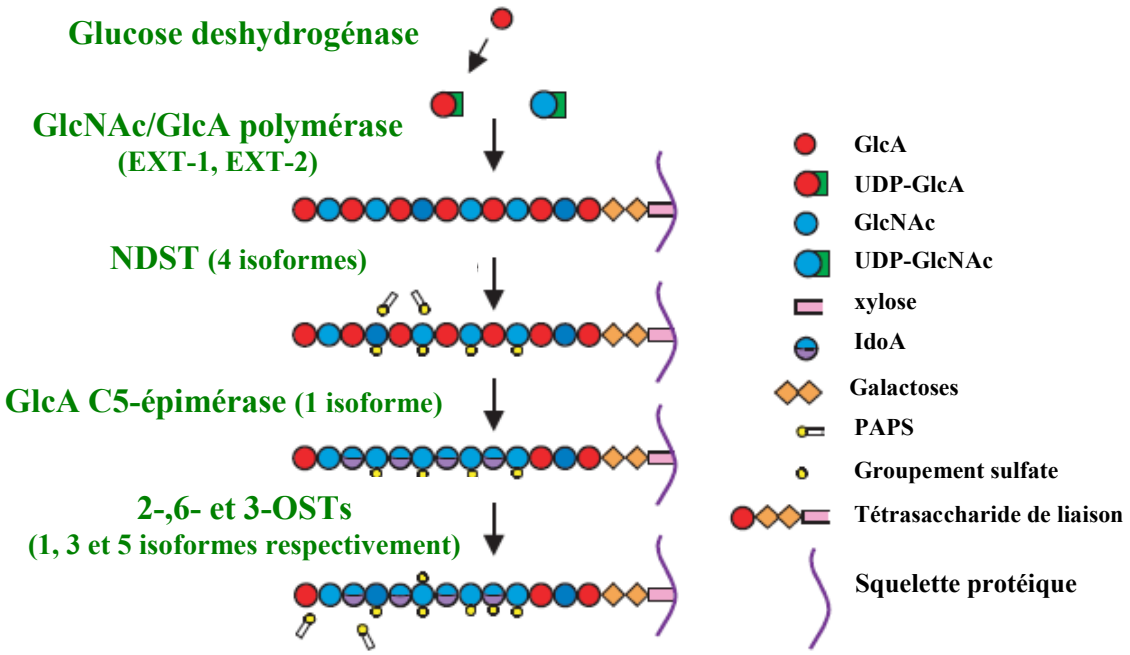


Figure RB 9 : Schéma des étapes de biosynthèse des chaînes d'HS

Les chaînes sont synthétisées à partir d'un squelette protéique par des actions séquentielles de différentes glycosyltransférases. Tout d'abord, un tétrasaccharide de liaison est formé, suivi par l'ajout alternatif de résidus GlcA et GlcNAc. Cette chaîne est par la suite modifiée par des processus de dé-acétylation, de N-sulfatation, d'épimérisation et de O-sulfatations produisant une très grande diversité structurelle dans le groupe des chaînes d'HS.

Abréviations : « « GlcA » = acide glucuronique ; « GlcNAc » = N-acétyl-glucosamine ; « IdoA » = acide iduronique; « NDST » = N-désacétylase/ N-sulfo-transférase; « OST » = O-sulfo-transférase ; « PAPS »= groupement sulfate de l'adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate.

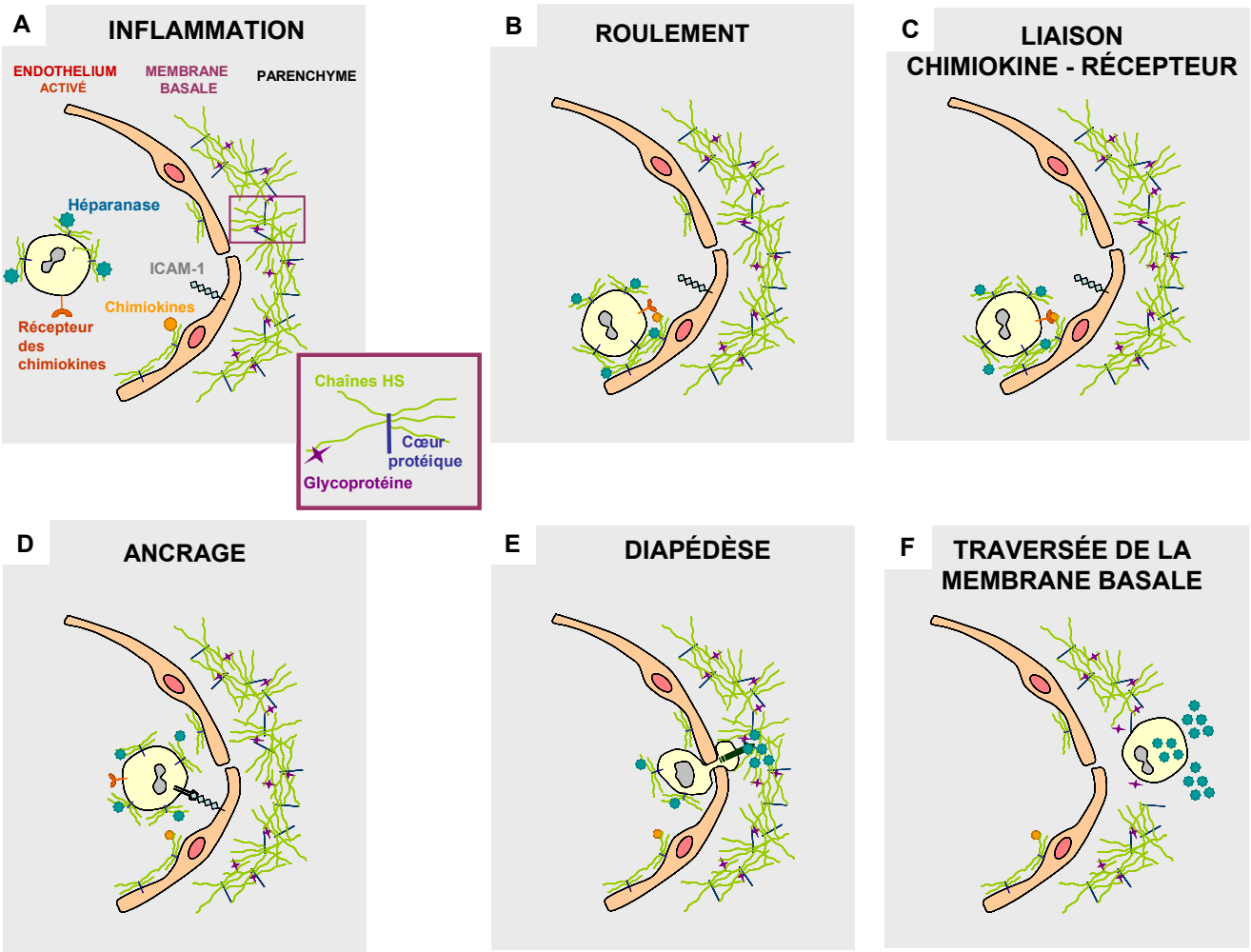


Figure RB11 : Implications des chaînes d'HS dans les étapes clés de la pénétration tissulaire de monocyte au travers de l'endothélium au niveau du site inflammatoire.

Au niveau du site d'inflammation, les cellules endothéliales présentent à leur surface du côté luminal du vaisseau sanguin de nombreux HSPG et certaines molécules spécialisées dans l'adhérence cellulaire telles que ICAM-1 (**A**). Les chaînes d'HS de ces PG lient les chimiokines qui sont produites par le tissu avoisinant et qui ont traversé l'endothélium (**A**). Les chaînes d'HS endothéliales sont impliquées dans la transcytose vers le compartiment vasculaire de ces chimiokines produites par le tissu inflammatoire. De leur côté, les monocytes circulants présentent à leur surface de nombreuses chaînes d'HS capables de lier l'héparanase et présentent des récepteurs membranaires de chimiokines (**A**). Lorsque les monocytes entrent en contact avec l'endothélium, il se crée des interactions faibles entre les molécules de surface des monocytes et les molécules de l'endothélium capillaire: on parle de la phase de **roulement**. Parmi ces interactions faibles, l'héparanase présentée à la surface des monocytes, où elle est liée aux chaînes d'HS, interagit avec les chaînes d'HS de l'endothélium (**B**). Lors du roulement, les récepteurs des chimiokines exprimés en surface des monocytes rencontrent les chimiokines de l'endothélium capillaire portées par les chaînes d'HS (**C**). Cette fixation favorise non seulement l'adhérence non jonctionnelle des monocytes à l'endothélium capillaire mais active également l'expression des gènes d'intégrines membranaires par les monocytes. Les intégrines membranaires des monocytes se lient avec les molécules d'adhérence de l'endothélium, ce qui permet un **ancrage** à la paroi endothélial (**D**). Une fois ancrée, les monocytes migrent entre les cellules endothéliales (**E**). Il se pourrait que les chaînes d'HS favorisent cette migration transendothéliale. Les monocytes pénètrent dans le tissu et rencontrent la membrane basale, un complexe multi-moléculaire riche en chaînes d'HS (perlecane, agrine…), qui constitue un véritable obstacle à leur progression (**E**-**F**). Les monocytes synthétisent alors plus d'héparanase, et l'activent pour dégrader les chaînes d'HS de la membrane basale et faciliter leur pénétration. Par ailleurs, la dégradation des chaînes d'HS de la membrane basale libère de nombreux facteurs qui y étaient stockés; ces facteurs pouvant par la suite amorcer de nombreux processus impliqués dans la phase chronique de l'inflammation, tels que l'angiogenèse.

Abréviations: HS, sulfate d'héparane; ICAM-1, molécule d'adhérence intercellulaire-1.

IV. L'héparanase : enzyme de dégradation des chaînes de sulfate d'héparane

IV.A. PRESENTATION ET CARACTERISATION DE L'HEPARANASE

L'activité enzymatique de dégradation des chaînes d'HS qui sera présentée ici concerne l'hydrolyse de la liaison glycosidique. Cette hydrolyse ne concerne qu'un nombre limité de sites intra-chaînes et produit des fragments de chaînes d'HS de taille moyenne (entre 10 et 20 unités di-saccharidiques d'environ 5-7 kDa) [78,218,310]. Cette activité est très différente de celle des héparinases bactériennes [218] et des exo-glucuronidases qui dépolymérisent les chaînes d'HS uniquement par leur extrémité. Actuellement, une seule endo-glycosidase spécifique des chaînes d'HS a été identifiée chez les mammifères [118,147,288,309]. Chez l'homme, elle est qualifiée d'héparanase-1 puisqu'une enzyme, qui présente une identité de 35% avec elle, a été nommée abusivement héparanase-2 [174]. En effet, cette héparanase-2 est différente de l'héparanase-1, puisqu'elle ne présente ni la même distribution tissulaire, ni les mêmes résidus en acides au niveau du site catalytique [174], ce qui suggère que l'héparanase-2 humaine ne dégrade pas les chaînes d'HS.

IV.A.1. Structure génique et protéique de l'héparanase

L'héparanase est une endo-β-D-glucuronidase qui a été mise en évidence à partir de cellules de mélanomes métastatiques murins [186] et retrouvée par la suite chez l'homme dans les plaquettes sanguines et dans les monocytes [114]. Le gène de l'héparanase a été séquencé chez l'homme [118,147,288,309], le rat [118] et la souris [176]. Chez l'homme, il est d'environ 50 kb et est situé en position 4q21.3 [61]. Le transcrit de ce gène présente 14 exons et 13 introns et conduit à la formation de deux formes d'ARNm, la forme 1a de 5 kb et la forme 1b de 1,7 kb, générées par différence d'épissage des exons 1 et 14 [61]. Chez le rat, ce gène est en 14p22 (Gene ID 64537). Deux formes d'ARNm ont été identifiées chez la souris, l'une de 3,2 kb et l'autre de 1,9 kb, avec la même distribution tissulaire que les formes humaines [54].

Chez l'homme, les formes 1a et 1b de l'ARNm ont le même cadre de lecture et permettent la synthèse d'une protéine de 543 acides aminés et de 61,2 kDa. L'héparanase contient une séquence de « signalisation » en position N-terminal de 35 acides aminés (Met^{1}-Ala^{35}), et une séquence analogue à un domaine hydrophobe en position C-terminal (Pro^{515}-Ile^{534}) qui pourrait correspondre à un domaine transmembranaire [210]. Par ailleurs, deux

domaines qui correspondent aux séquences consensus de liaison aux chaînes d'HS, Lys^{158}-Asp^{162} et Pro^{271}-Met^{278} sont localisés dans la sous-unité de 50 kDa [154]. Chez les rongeurs, l'héparanase présente quasiment la même séquence [118,176].

La forme active de l'héparanase est un hétérodimère des sous-unités de 50 kDa (Lys^{158}-Ile^{543}) et de 8 kDa (Gln^{36}-Glu^{109}) (***Figure RB12)***. Ces sous-unités résultent de la coupure protéolytique de la pro-héparanase qui libère également un polypeptide intermédiaire de 6 kDa (Ser^{110}-Gln^{157}) [71,155,175]. L'activité enzymatique de dégradation des chaînes d'HS est au moins 100 fois supérieure sous la forme hétérodimère que sous la forme pro-enzyme [309]. Par ailleurs, l'hétérodimère actif de l'héparanase adopterait une structure en tonneau de TIM, similaire à celle des autres glycosyl-hydrolases [119] et qui consiste en l'alternance de huit hélices α et feuillets β. La sous-unité de 50 kDa présenterait six hélices α et six feuillets β [190]. Les deux unités α/β manquant à la structure en tonneau de TIM se situent vraisemblablement au sein de la sous-unité de 8 kDa. Enfin, la demi-vie de l'héparanase est d'environ 30 h [89].

IV.A.2. Maturation et activation de l'héparanase

L'activité enzymatique de l'héparanase nécessiterait l'association entre les deux sous-unités identifiées (50 kDa et 8 kDa) [211]. La région N-terminal de la protéine est essentielle à l'activité enzymatique de l'héparanase, puisque l'expression d'une forme tronquée contenant uniquement la sous-unité de 50 kDa produit une protéine sans activité enzymatique [119]. Récemment, deux sites de coupure ont été identifiés grâce à des approches de mutagenèse dirigée, le site 1 (Glu^{109}-Ser^{110}) et le site 2 (Gln^{157}-Lys^{158}) [1]. Les enzymes du lysosome seraient responsables de la maturation de l'héparanase. En effet, l'incubation de la pro-enzyme purifiée de l'héparanase de 65 kDa en présence de cathepsine L, une cystéine-peptidase du lysosome engendre une héparanase mature [1]. En outre, la maturation et l'activation de l'héparanase sont altérées en présence d'inhibiteurs spécifiques de la cathepsine L [1]. Toutefois, la nature exacte des enzymes impliquées dans la maturation protéolytique de l'héparanase demeure, à ce jour, inconnue.

IV.A.3. Trafic intracellulaire et localisation subcellulaire de l'héparanase

Figure RB13

La pro-héparanase, une fois synthétisée, serait ensuite acheminée vers l'appareil de Golgi, à partir duquel elle serait sécrétée dans l'environnement extracellulaire [93,118,309]. Une fois dans l'environnement extracellulaire, la pro-héparanase se lie à des HSPG membranaires et cette liaison selon toute vraisemblance favorise son internalisation par

endocytose [89,182,308 ,313]. D'autres récepteurs de surface, tels que les récepteurs du mannose 6-phosphate, pourraient également être impliqués dans l'internalisation de l'héparanase [313]. Il se pourrait, par ailleurs, que la maturation protéolytique de l'héparanase se produise dans certaines conditions à la surface de la cellule [182]. Cette dernière hypothèse est toutefois controversée puisque de nombreuses études ciblent plutôt les lysosomes comme site de maturation et d'activation de l'héparanase. En effet, le développement récent d'anticorps spécifiques discriminant la forme latente de 65 kDa de la forme active de 50 kDa permet de localiser les deux formes de l'héparanase dans les lysosomes [91,333], où elle serait stockée plusieurs heures sous la forme active [91]. En outre, la maturation protéolytique de l'héparanase est plus efficace à un pH acide (pH 4-5) et se déroule correctement lorsque le précurseur est incubé en présence de préparations de lysosomes [46]. Enfin, la maturation est altérée par des inhibiteurs réversibles des protéases des lysosomes tels que la chloroquine ou par des inhibiteurs de la pompe à protons, tels que la bafilomycine A1 [333]. La plupart de ces études sont réalisées sur des lignées de cellules en culture qui sont, soit transfectées pour exprimer de façon stable le gène de l'héparanase, soit mises en présence de la forme latente de l'héparanase dans leur milieu de culture. Il se pourrait alors que ces situations ne reflètent pas exactement la réalité physiologique.

Ainsi, dans les cellules de l'organisme qui exprime le gène de l'héparanase, cette enzyme serait activée dans les lysosomes, où elle resterait stockée sous forme stable de nombreuses heures en dépit de l'environnement propice à la dégradation des protéines. Les chaînes d'HS présentes à la surface de la cellule seraient d'abord internalisées et dégradées partiellement par l'héparanase dans les lysosomes (syndécanes) et/ou dans les endosomes tardifs (glypicanes). Les résidus (fragments d'HS) seraient ensuite coupés par les extrémités par des enzymes des lysosomes qui les transforment en monosaccharides [35,126,327]. Bien que la présence extracellulaire de l'héparanase active soit faible dans les conditions physiologiques, elle serait suffisante, combinée avec la présence extracellulaire de la pro-héparanase, pour dégrader les chaînes d'HS environnantes liées à des corps protéiques secrétés, comme les perlecanes. Toutefois, sous l'influence de certains facteurs spécifiques, l'héparanase active contenue dans les lysosomes peut être secrétée dans l'environnement extracellulaire, augmentant de ce fait fortement sa bio-disponibilité extracellulaire [44,260].

Enfin, l'héparanase pourrait se retrouver dans certaines conditions dans le noyau [62,144,198-200,255,281], où il n'est pas exclu qu'elle y soit activée. En effet, en culture, les cellules de gliome humain (U87) (qui ne produisent pas l'héparanase) présentent rapidement la forme de 50 kDa dans leur noyau après ajout dans le milieu de la forme latente de 65 kDa [255]. Dans le noyau, l'héparanase active est co-localisée avec des chaînes d'HS [255]. La présence dans le noyau de ces dernières dans différents types cellulaires [74,75,128,129,235]

n'est encore pas compris. Il a été émis l'hypothèse que les chaînes d'HS soutiennent le transfert nucléaire des protéines qui leur sont liées, puisque le FGF-1 ou le FGF-2 sont également détectées dans le noyau [33,274,275,292]. Par ailleurs, l'héparanase dégraderait dans le noyau les chaînes d'HS qui s'y trouvent [144,255], et pourrait par conséquent libérer les protéines liées. Ceci pourrait expliquer que la présence de l'héparanase dans le noyau soit corrélée avec le degré de différenciation de certaines cellules [144 ,198,200]. Par exemple, la présence importante de l'héparanase dans le noyau induit la différenciation de cellules de carcinome de sein humain de la lignée MCF-7 en cellules glandulaires qui synthétisent alors des constituants du lait [199]. De plus amples investigations sont toutefois nécessaires pour caractériser les fonctions de l'héparanase dans le noyau.

IV.B. IMPLICATION DE L'HEPARANASE DANS LES PROCESSUS DE MIGRATION CELLULAIRE

IV.B.1. Cas des métastases cancéreuses

IV.B.1.a. Augmentation de la production d'une héparanase active

Les lignées de cellules tumorales les plus métastatiques contiennent un plus fort taux d'ARNm de l'héparanase que les lignées de cellules non métastatiques [118,309]. Il est fort vraisemblable que, dans ces cellules, cet ARNm soit traduit en protéine, puisque les lignées de cellules tumorales au potentiel métastatique le plus élevé, présentent une plus forte activité enzymatique spécifique de l'héparanase que celles au potentiel métastatique faible [188,236]. Par ailleurs, le plus fort taux d'ARNm de l'héparanase est retrouvé dans les prélèvements tissulaires de patients qui ont développé un grand nombre de métastases [90,173,248,281,282]. Enfin, l'héparanase est retrouvée en abondance au niveau du front invasif de la tumeur dans certains carcinomes [20,90,200,282].

IV.B.1.b. Implication de l'héparanase dans les métastases

L'expression du gène de l'héparanase par les cellules tumorales inoculées chez les rongeurs favorise non seulement la croissance des tumeurs primaires, mais aussi la survenue de nombreuses métastases spontanées dans différents organes [137,309,328]. En revanche, l'inhibition dans les cellules tumorales de l'expression de cette enzyme diminue fortement leur pouvoir métastatique et leur capacité de migration en culture au travers d'une matrice Matrigel [64 ,295 ,334,336]. Ceci indique que les cellules tumorales sur-expriment le gène de l'héparanase pour pénétrer et coloniser les tissus.

IV.B.1.c. Sécrétion de l'héparanase

La transformation maligne d'une tumeur ne semble pas uniquement associée à une sur-production locale de l'héparanase. Une modulation de sa localisation subcellulaire qui favorise sa représentativité extracellulaire pourrait être également impliquée dans ce processus. En effet, les patients atteints de certains carcinomes qui présentent dans leur prélévement tissulaire l'héparanase dans le noyau des cellules qui la synthétise ont une issue plus favorable que ceux qui présentent cette enzyme dans le cytoplasme [62,200,281]. Dans le cytoplasme, l'héparanase est vraisemblablement contenue dans les lysosomes et elle resterait ainsi disponible pour une libération dans le milieu extracellulaire.

En surface ou sécrétée dans l'environnement extracellulaire, l'héparanase favorise les capacités de migration des cellules qui la synthétise. En effet, lorsque les cellules tumorales présentent à leur surface l'héparanase ou la sécrétent dans le milieu extracellulaire, leur dissémination métastatique est fortement accélérée après leur inoculation chez la souris [92,93]. En outre, l'héparanase a été détectée en abondance à la surface des cellules tumorales dans les prélévements tissulaires issus de patients atteints de carcinome du colon [82]. Il est possible que l'héparanase soit sécrétée dans l'environnement extracellulaire à partir des lysosomes. En effet, les cellules tumorales transfectées de façon stable avec l'ADNc de l'héparanase sécrétent, en culture, la forme active de cette enzyme à la suite d'un traitement qui stimule la protéine kinase C [247,260]. Ce même traitement stimule également la sécrétion de la cathepsine D (une enzyme des lysosomes) [260], ce qui suggère bien que l'héparanase est sécrétéé à partir des lysosomes. En outre, la cathepsine B, une autre enzyme des lysosomes, est retrouvée à la surface de cellules cancéreuses [83,241], ce qui suggère que le développement tumoral est une situation associée à une sécrétion du contenu des lysosomes dans l'environnement extracellulaire.

Dans le cas des métastases, les cellules tumorales expriment fortement le gène de l'héparanase et elles sécrétent cette enzyme dans l'environnement extracellulaire pour faciliter leur progression dans le tissu et ainsi le coloniser. Les cellules immunocompétentes qui doivent entrer dans un tissu présentent-elles le même mécanisme ?

IV.B.2. Cas de l'infiltration des cellules immuncompétentes périphériques

IV.B.2.a. Synthèse de l'héparanase active par les cellules du système immunitaire

En culture, les lymphocytes activés et non quiescents [81,187,189,250], les monocytes circulants et les macrophages [99,249,250,259,263,325], les neutrophiles [2,114,145,171,172], les lymphocytes B [150] et enfin les cellules dendritiques [22]

présentent une activité enzymatique de dégradation spécifique des chaînes d'HS. Dans ces cellules, cette activité enzymatique résulte de la production d'héparanase [77,120]. En effet, les leucocytes humains dérivés du sang contiennent fortement les deux formes d'ARNm de l'héparanase [118], ces dernières étant également largement retrouvées dans les organes lymphoïdes [118 ,147,174]. Plus précisément, l'ARNm de l'héparanase et la sous-unité de 50 kDa ont été détectées aussi bien dans les neutrophiles humains [145] que dans les monocytes humains dérivés du sang [22]. Dans les monocytes CD-14 positifs isolés, l'héparanase est localisée à la surface des cellules [247] et cette localisation favorise, en culture, les capacités invasives des macrophages [247]. Par ailleurs, lorsque les leucocytes s'activent, ils présentent une activité enzymatique de l'héparanase augmentée [81,189], ce qui pourrait résulter de l'activation de l'expression du gène de cette enzyme par des signaux pro-inflammatoires. En effet, la région du promoteur de ce gène présenterait non seulement un site putatif de liaison au facteur de de croissance précoce 1 (Egr-1 pour early growth factor) [53] mais aussi deux sites putatifs de liaison aux facteurs de transcription activés par l'interféron [65,122]. En culture, le facteur Egr-1 induit l'expression du gène de l'héparanase par les lymphocytes T [53] et l'Il-1β et le TNF-α stimulent non seulement l'expression de ce gène mais aussi l'activité enzymatique de l'héparanase par les cellules endothéliales [44,65].

IV.B.2.b. Implication de l'héparanase dans l'infiltration tissulaire

Lorsque les souris sont préalablement exposées à un antigène sous la peau de l'abdomen et que, quelques jours après, ce même antigène leur ait de nouveau présenté à l'oreille, elles développent généralement une réaction d'hyper-sensibilité. Pour que cette réaction se déclenche, cela nécessite que les macrophages (ou les cellules dendritiques) aient reconnu la première fois l'antigène à la peau et qu'ils aient migré jusqu'aux ganglions lymphatiques pour le présenter aux lymphocytes T. Ces derniers gardent en mémoire l'antigène et sont alors capables d'intervenir rapidement à l'oreille lors de la ré-exposition. L'administration d'ARNi anti-héparanase bloque chez la souris le déclenchement de la réaction d'hyper-sensibilité [65], ce qui suggère que ce traitement a altéré les capacités migratoires des cellules du système immunitaire.

Dans un contexte inflammatoire, les cellules endothéliales et les cellules du système immunitaire coopèreraient pour faciliter l'entrée de ces dernières dans le parenchyme tissulaire.

IV.B.3. Rôles putatifs joués par l'héparanase dans l'infiltration tissulaire de cellules

Les cellules tumorales et les cellules du système immunitaire emprunteraient la « voie » de l'héparanase pour s'infiltrer dans un tissu. Cette « voie » est caractérisée par une augmentation du taux de l'ARNm de l'héparanase, par une maturation protéolytique efficace de cette enzyme, par une augmentation de l'activité enzymatique et enfin par la présentation à la surface des cellules de cette enzyme active et/ou sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. Le rôle joué par l'héparanase à la surface de la cellule pourrait être dépendant du contexte biologique (***Figure RB14***). En effet, à pH physiologique (pH>7,2), l'héparanase (et vraisemblablement surtout la pro-héparanase) pourraient jouer, indépendamment de son activité enzymatique, le rôle de molécule d'adhérence à l'endothélium capillaire [87,94,120,273], ce qui faciliterait la sortie du flux sanguin des cellules qui la présente en surface. Dans un contexte inflammatoire ou métastatique (environnement légèrement acide (6,2<pH<6,8)), des signaux pro-inflammatoires ou tumoraux stimuleraient l'augmentation de l'expression du gène et de l'activité enzymatique de l'héparanase (optimale dans cette fourchette de pH [87]) par les cellules endothéliales et par les cellules du système immunitaire. Ceci permettrait alors aux cellules qui produisent l'héparanase active de dégrader les chaînes d'HS présentes dans la membrane basale [209] et de migrer en dégradant les chaînes d'HS de la MEC du tissu vers le parenchyme (***Figure RB14***).

La dégradation des longues chaînes par l'héparanase produit de plus petites chaînes d'HS et libère de nombreux facteurs qui leur étaient liés. Ceci conduit non seulement à un remodelage de la MEC propice à l'infiltration des cellules mais aussi à divers effets biologiques dus aux courtes chaînes et aux facteurs libérés. Certains de ces facteurs pourraient venir soutenir l'accumulation et la survie de ces cellules invasives dans le parenchyme tissulaire, comme par exemple le VEGF [9,146,192,212] ou le FGFb [15,76,127,143,311] qui stimulent une néovascularisation [143,222,223 ,226]. Ceci pourrait indirectement être responsable des propriétés pro-angiogéniques attribuées à l'héparanase [64,67,92,122,307,308,310] (***Figure RB14***). Par ailleurs, les chimiokines MIP-1β ou RANTES [88 ,296] pourraient être également libérer et venir accentuer l'infiltration de cellules de l'immunité en exerçant un chimiotactisme positif. En revanche, les courtes chaînes d'HS générées limiteraient l'ampleur de la réaction inflammatoire en inhibant la sécrétion par les leucocytes de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α actif [156].

IV.C. L'HEPARANASE DANS LES TISSUS NON IMMUNS

IV.C.1. Hors du système nerveux central

Le placenta présente un très fort taux d'ARNm de l'héparanase [57,118,147 ,174], la protéine y étant également largement détectée [57]. En culture, les cytotrophoblastes expriment le gène de l'héparanase [96] et ces cellules contiennent la protéine dans les prélévements tissulaires issus de césarienne [57]. La synthèse d'héparanase par les cytotrophoblastes du placenta serait liée au potentiel migratoire de ces cellules. En effet, dans le placenta, les cytotrophoblastes migrent pour former de nouveaux vaisseaux sanguins et constituer un pont entre la circulation sanguine maternelle et fœtale. La dégradation des chaînes d'HS de la matrice placentaire par l'héparanase faciliterait cette vascularisation en libérant des facteurs pro-angiogéniques tels que le FGFb [96]. En outre, les lysats de plaquettes sanguins présentent présentent une activité enzymatique propre à l'héparanase [202,319]. Il est possible que les plaquettes sanguines produisent de l'héparanase pour favoriser une coagulation locale par la perte des propriétés anticoagulantes de l'héparine et des chaînes d'HS après coupure [56]. Enfin, les fractions de lysosomes de foie de rat présentent également une activité enzymatique propre à l'héparanase [115]. Le foie correspond à l'organe où sont détruites les plaquettes sanguines et où sont hébergés les leucocytes vieillissants.

Ainsi, pendant de nombreuses années, l'expression du gène de l'héparanase était considérée restreinte dans les conditions physiologiques au placenta, aux cellules endothéliales et aux cellules du sang hormis les hématies. Toutefois, une activité enzymatique de l'héparanase a été récemment mesurée de façon inattendue dans d'autres tissus tels que l'épiderme, où l'héparanase est synthétisée par les cellules de Langerhans, des cellules immunocompétentes tissulaires proches des cellules dendritiques, et par les kératinocytes. Sa synthèse par les kératinocytes serait impliqué dans les processus de différenciation de ces dernières au cours de la desquamation [23].

Chez les souris transgéniques qui sur-expriment le gène de l'héparanase, le nombre d'embryons implantés chez les femelles est plus important [332], ce qui confirme l'implication de l'héparanase dans l'implantation de l'embryon dans l'utérus. En outre, ces souris développent une protéinurie associée à une altération de l'architecture des podocytes dans les néphrons [332]. L'augmentation de la synthèse de l'héparanase par les cellules du rein favoriserait la dégradation des chaînes d'HS présentes dans la membrane basale du glomérule et diminuerait ainsi les charges négatives de la membrane basale impliquées dans la rétention vasculaire des protéines. Ceci est d'autant plus cohérent qu'une augmentation du

taux d'ARNm de l'héparanase a été mesurée dans le rein au cours de certaines néphropathies [299]. Enfin, les souris transgéniques présentent non seulement un tissu mammaire plus vascularisé et des glandes mammaires plus canalisées, mais aussi une vascularisation des follicules pileux plus importante et une repousse des poils accélérée [332].

IV.C.2. Dans le système nerveux central

La présence d'héparanase dans le cerveau a peu été étudiée, malgré l'abondance des chaînes d'HS dans l'environnement extracellulaire de ce dernier. La forme 1a d'environ 5 kb de l'ARNm de l'héparanase a été détectée dans le cerveau humain [118] et l'ARNm de l'héparanase a récemment été détecté dans la moelle épinière (ME) de rat [335], où il est contenu dans les neurones de la matière grise [335]. En culture, les astrocytes expriment le gène de l'héparanase en réponse au NGF [165], une activité de dégradation des chaînes d'HS étant retrouvée dans les extraits de ces astrocytes traités au NGF [165]. Cette activité enzymatique est plus importante en présence des cellules de mélanomes capables *in vivo* de coloniser le parenchyme cérébral [165], ce qui suggère un processus de coopération cellulaire pour pénétrer dans le cerveau entre les premières cellules du parenchyme rencontrées, les astrocytes, et les cellules tumorales. Au contact du parenchyme cérébral et de certains facteurs paracrines, les cellules métastatiques de mélanome seraient ainsi capables de stimuler leur expression du gène de l'héparanase et l'activité de cette dernière. Le NGF serait impliqué dans ce processus, puisqu'au cours de leur transformation maligne, ces cellules tumorales sur-produisent le récepteur des neurotrophines $p75^{NTR}$ [195], également synthétisé par les astrocytes [331]. En culture, les capacités invasives des cellules de mélanomes sont augmentées en présence de NGF [166].

L'expression constitutive du gène de l'héparanase par les cellules du cerveau, en particulier les neurones et les astrocytes, mérite de plus amples investigations. En outre, il est possible que certaines cellules du cerveau activent leur expression du gène de l'héparanase en présence de cellules invasives qui produisent cette enzyme ou au cours de certaines situations physio-pathologiques.

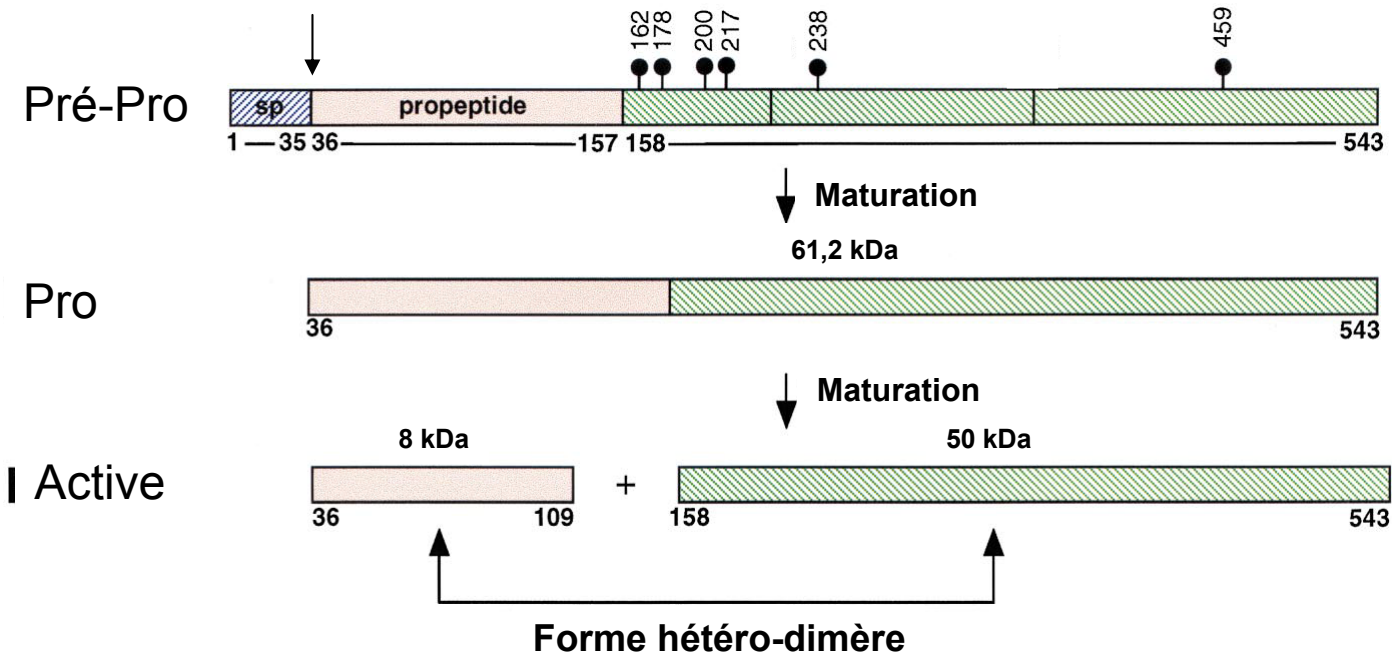


Figure RB12 : Structure prédictive et schéma de maturation de l'héparanase humaine

Cette enzyme serait synthétisée sous forme d'un précurseur (pré-pro-forme), qui est transformé en une forme inactive (pro-forme) à la suite de la coupure du peptide de signalisation. Des processus de maturation transforment ensuite cette pro-forme en une enzyme mature et active. Ces processus sont notamment la coupure d'un peptide intermédiaire (Ser^{110}-Gln^{157}), qui donne alors naissance à deux polypeptides : l'un de 8 kDa (Gln^{36}-Glu^{109}) et l'autre de 50 kDa (Lys^{158}-Ile^{543}). Ces deux entités s'associent ensuite pour former un hétéro-dimère. Par ailleurs, les sites prédictifs de N-glycosylation sont indiqués par des cercles noirs (N162, 178, 200, 217, 238 et 459).

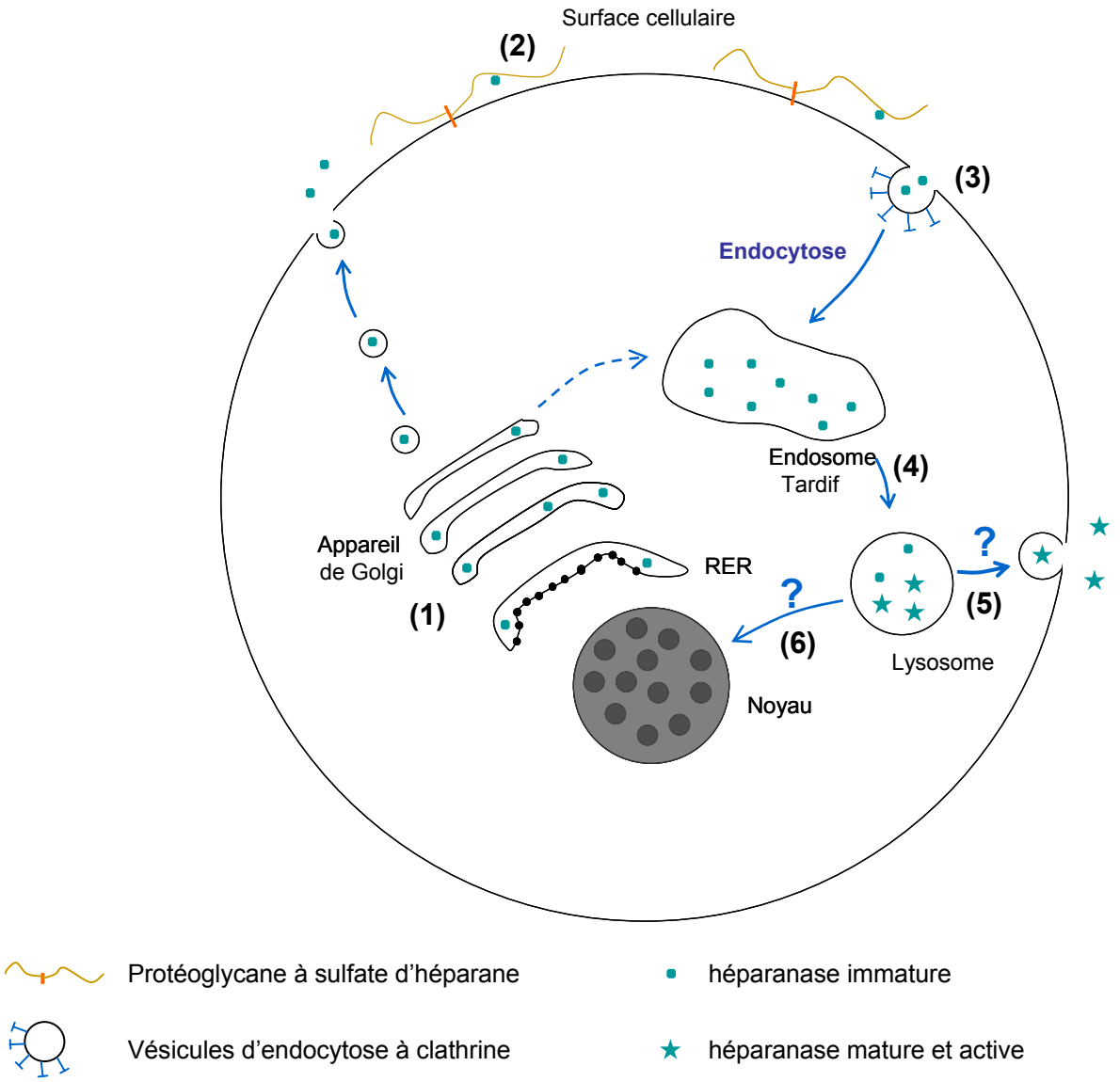


Figure RB13 : Trafic intracellulaire et localisation subcellulaire de l'héparanase

(1) L'héparanase est synthétisée sous forme d'une pré-pro-enzyme contenant un peptide de signalisation, empruntant la voie qui mène du reticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi. Ce trafic serait régulé par certaines glycosylations de la protéine (Simizu et coll., 2004). **(2)** La forme latente de l'héparanase est ensuite secrétée dans l'environnement extracellulaire sous forme d'une pro-enzyme, où elle se lie aux chaînes de sulfate d'héparane présentes à la surface de la cellule, et notamment les syndécanes (Nadav et coll., 2002 ; Gingis-Velitski et coll., 2004). **(3)** Cette liaison facilite son internationalisation impliquant vraisemblablement les récepteurs au mannose-6-phosphate (Vreys et coll., 2005). **(4)** Une fois internalisée, le précurseur de l'héparanase se retrouve dans les endosomes tardifs (Nadav et coll., 2002; Zetser et coll., 2004), puis dans les lysosomes (Goldshmidt et coll., 2002; Zetser et coll., 2004) où elle est activée en héparanase mature (Zetser et coll., 2004; Cohen et coll., 2005). **(5)** Ensuite, l'héparanase active peut être secrétée des lysosomes vers l'environnement extracellulaire sous contrôle de signaux moléculaires spécifiques des types cellulaires exprimant l'héparanase. Par exemple, le traitement des cellules tumorales à base de 12-myristate 13-acetate de phorbol (PMA) ou de forskoline induit une sécrétion lysosomale de l'héparanase mature et active (Shafat et coll., 2006). **(6)** Il est également possible que l'héparanase active soit transférée dans le noyau où elle participerait à faire entrer la cellule cancéreuse dans des processus de différenciation (Nobuhisa et coll., 2005; Nobuhisa et coll., 2007).

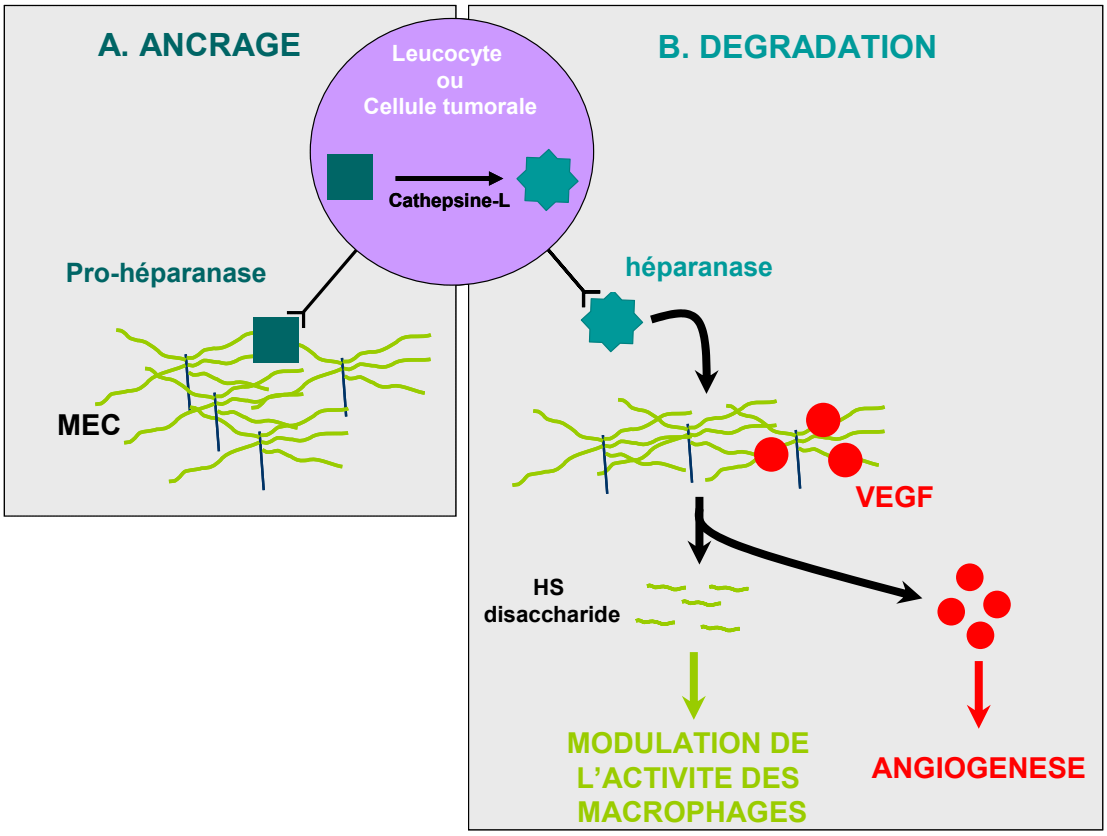


Figure RB14 : Mécanismes proposés pour la traversée de la barrière endothéliale par la « voie » de l'héparanase

L'héparanase est synthétisée sous la forme d'un précurseur. Sous cette forme, l'héparanase présentée à la surface cellulaire jouerait un rôle de molécule d'adhérence aux chaînes d'HS de la MEC, des chaînes d'HS de l'endothélium ou encore des chaînes d'HS des membranes basales (**A**). Dans un contexte inflammatoire ou de transformation tumorale, la pro-héparanase est activée, vraisemblablement par des enzymes des lysosomes telles que la cathépsine-L. Les cellules invasives (leucocytes ou cellules tumorales) présentent alors l'héparanase à leur surface, ce qui favorise leur pénétration par la dégradation des chaînes d'HS extracellulaires (**B**). Les produits de dégradation, les fragments de chaînes d'HS, pourraient exercer des effets biologiques propres, tels que l'inhibition de la sécrétion de TNF-α actif par les macrophages. En outre, la dégradation des chaînes d'HS libère les facteurs qui y étaient stockés, comme le VEGF par exemple qui est impliqué dans des processus d'angiogenèse.

Abréviations: TNF, facteur de nécrose tumoral (*tumor necrosis factor*); VEGF, facteur de croissance des vaisseaux sanguins (vascular endothelial growth factor); HS, sulfate d'héparane; MEC, matrice extracellulaire.

MATERIELS ET METHODES

Toutes les expériences sur les animaux décrites ci-dessous ont été réalisées en accord avec la réglementation européenne (décret 86/609) et la loi française (décret 87/848) régissant l'expérimentation animale. Tous les efforts ont été mis en œuvre pour diminuer la souffrance des animaux et réduire leur nombre au cours des expériences.

EXPERIMENTATION *IN VIVO*

I. Animaux et conditions d'hébergements

I.A. ETUDES REALISEES SUR L'EPILEPTOGENESE APRES *STATUS EPILEPTICUS* INDUIT PAR LA PILOCARPINE CHEZ LE JEUNE RAT ADULTE

- EXPERIMENTATIONS 1, 2a et 2b -

I.A.1. Pendant la phase d'acclimatation aux conditions d'hébergement

Les animaux utilisés étaient des rats mâles de la souche Sprague-Dawley, c'est-à-dire des rats albinos de lignée non consanguine, fournis par Harlan France®. Les ratons mâles ont été réceptionnés à l'âge de 15 jours et ont été hébergés avec une mère nourricière dans la nurserie d'une animalerie conventionnée (période lumineuse 6-18 h, température 21°C ± 1, hygrométrie contrôlées 45%± 3). A l'âge de 21 jours, les jeunes rats ont été sevrés et ensuite repartis aléatoirement à raison de 5-6 dans des cages transparentes (Bac Polycarbonate E, 450x300x200 mm, Charles River®) placées dans une salle ne contenant plus aucune femelle.

Dès le premier jour de leur arrivée à l'animalerie, les rats ont été manipulés régulièrement par les expérimentateurs pour limiter les effets du stress qui pourraient perturber les constantes physiologiques. En outre, les rats ont été pesés tous les deux jours pendant la phase d'acclimatation à l'animalerie pour suivre leur croissance et ont eu un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Leur nourriture était à base de croquettes spécialisées pour animaux de laboratoire (Aliments pour rongeurs type 04, SAFE®).

I.A.2. A la suite du status epilepticus

L'ensemble des traitements pharmacologiques décrits ci-dessous a été réalisé sur des rats mâles âgés de 7 semaines (P42). À la suite du traitement à base de pilocarpine, des rats ont développé en forte proportion un *status epilepticus (SE)*, qui est défini comme étant une succession de nombreuses crises de type tonico-clonique dans un intervalle de temps très court (voir II.A.3). A la suite de l'induction du *SE* par la pilocarpine, les rats ont été hébergés en cage individuelle (référence en I.A.1 des *Matériels et méthodes*) pour favoriser leur récupération physiologique. En revanche, les rats témoins n'ayant pas reçu d'administration de pilocarpine ont été hébergés à raison de 5 rats par cage (référence en I.A.1 des *Matériels et méthodes*) et n'ont jamais été isolés jusqu'à leur sacrifice. En effet, si l'isolement s'impose chez le rat souffrant afin qu'il recouvre plus rapidement ses constantes physiologiques, l'isolement social de l'animal sain constitue en revanche un véritable stress, ce qui perturbe considérablement certaines constantes physiologiques et son comportement [153]. Les rats ont toujours été sacrifiés entre 8 heures (h) du matin et midi, hormis pour le point de cinétique 8 h après *status epilepticus* pour lequel les rats ont été sacrifiés environ vers 17h30.

I.B. ETUDES REALISEES AU COURS DE LA PERIODE POST-NATALE ET DU VIEILLISSEMENT CHEZ LE RAT MALE

- EXPERIMENTATION 3 -

I.B.1. Pour la période post-natale

I.B.1.a. Concernant les ratons âgés de P2

La même souche de rats du même fournisseur a été utilisée dans ces études (voir précédemment I.A.1 *Matériels et méthodes*). Des femelles en fin de gestation (E20) ont été réceptionnées et hébergées en cage individuelle dans la nurserie d'une animalerie conventionnée (période lumineuse 6-18 h, température 21°C ± 1, hygrométrie contrôlée 45%± 3). Cette nurserie ne contient aucun mâle non sevré, c'est-à-dire âgé de plus de 21 jours. Les femelles ont été surveillées par les expérimentateurs pour déterminer précisément le jour de leur mise à bas. Dès le premier jour de vie post-natale (P0), les ratons mâles ont été séparés des ratons femelles. Les ratons mâles ont ensuite été hébergés avec une mère nourricière à raison de 8 par cage (référence en I.A.1 des *Matériels et méthodes*). Les ratons ont ensuite été sacrifiés au deuxième jour de leur vie post-natale (P2), les sacrifices ayant toujours été réalisés entre 8 h du matin et midi.

I.B.1.b. Concernant les ratons âgés de P5, P8, P14 et P21

La même souche de rats du même fournisseur a été utilisée dans ces études (voir précédemment I.A.1 des *Matériels et méthodes*). Les ratons mâles ont été réceptionnés à différents temps de la période post-natale (P4, P7, P13 et P20) et hébergés dans des cages transparentes (référence en I.A.1 des *Matériels et méthodes*) à raison de 7-8 par cage avec une mère nourricière dans la nurserie de l'animalerie. Un jour après leur arrivée, les ratons mâles ont été sacrifiés, les sacrifices ayant toujours été réalisés entre 8 h du matin et midi.

I.B.2. Pour l'âge adulte (3 mois) et le vieillissement (12 mois)

Les rats ont été réceptionnés à l'âge de 3 mois et de 12 mois et ont été hébergés à raison de 5-6 dans des cages transparentes (référence en I.A.1 des *Matériels et méthodes*) placées dans la salle de l'animalerie ne contenant plus aucune femelle. Après une période d'acclimatation aux conditions environnementales de deux semaines, les rats âgés de 3 mois et de 12 mois ont été sacrifiés (période de sacrifice entre 8 h et 12 h).

II. Traitements pharmacologiques

II.A. INDUCTION DU *STATUS EPILEPTICUS* PAR L'ADMINISTRATION INTRAPERITONEALE DE PILOCARPINE

II.A.1. Préambule

L'épileptogenèse fait suite un état de mal ou *SE* provoqué par l'administration de pilocarpine et arrêté par l'administration de diazepam (Valium®). De nombreuses études préliminaires ont été réalisées pour installer ce modèle au sein de notre équipe, visant à déterminer la dose optimale de pilocarpine à injecter pour développer un *SE* en évitant la mort subite de l'animal. Par ailleurs, le protocole expérimental a évolué au cours de ces différentes études, passant d'une dose de pilocarpine injectée en intra-péritonéal de 300 mg/kg (D300) à 375 mg/kg (D375) et d'une durée de *SE* de 3 h à 2 h. Pour chacune des études, la dose de pilocarpine et la durée de *SE* seront précisées.

II.A.2. Effets des substances pharmacologiques utilisées

Figure MM1

Le **chlorure de pilocarpine** (P-6503, Sigma®) est solubilisé dans une solution de NaCl 0,9% à raison de 160 (D300) ou de 187,5 (D375) mg/mL. Elle est injectée par voie

systémique (voie intra-péritonéale, i.p) aux rats aux doses de 300 ou 375 mg/kg. La pilocarpine est un agoniste cholinergique des récepteurs muscariniques centraux et périphériques. Afin de limiter ses effets périphériques indésirables et d'éviter la mort subite de l'animal par arrêt cardiaque, les rats ont été traités, 30 minutes (min) avant son administration, avec de la méthyl nitrate **scopolamine** (0,5 mg/mL dans du NaCl 0,9% ; S-2250, Sigma®), un antagoniste des récepteurs muscariniques, qui, lorsqu'il est injecté à la dose de 1 mg/kg par voie sous-cutanée (s.c) ne présente aucun effet central. Dès l'injection de pilocarpine, toujours effectuée entre 8 h et 9 h du matin, le comportement des rats est surveillé pour déterminer le déclenchement du *SE*. Cette étude se base sur des critères établis par Racine en 1972 (voir paragraphe III.A.3 des *Matériels et méthodes*).

Le *SE* est arrêté par l'administration intra-péritonéale de **diazépam** (Valium®, 5 mg/mL, Roche) à la dose de 10 mg/kg, 2 ou 3 h après l'apparition de la première crise de stade 5. Le diazépam appartient à la famille des benzodiazépines, et il est connu pour ses propriétés anxiolytiques et anti-convulsivantes. Les benzodiazépines agissent comme modulateur allostérique positif des récepteurs de type GABA A, venant ainsi potentialiser la neurotransmission inhibitrice GABAergique.

II.B. TRAITEMENTS ANTI-INFLAMMATOIRES

Deux types de substances anti-inflammatoires classiquement utilisées ont été sélectionnés pour nos études, un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), l'**indométhacine**, et un anti-inflammatoire stéroïdien (AIS) de la classe des glucocorticoïdes, la **méthylprednisolone**.

II.B.1. Administration d'indométhacine

II.B.1.a. Préambule

Des études préalables réalisées au sein du laboratoire ont permis de déterminer le mode d'administration de l'indométhacine le plus adéquat pour observer un effet pertinent. En effet, il avait d'abord été choisi d'administrer une faible dose d'indométhacine (2,5 mg/kg) par voie intra-péritonéale 24 h et 30 min avant le traitement à base de pilocarpine. Toutefois, l'indométhacine est quasi insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool et peut être instable dans les solutions alcalines. Dans notre première étude utilisant cet anti-inflammatoire non stéroïdien réalisée sur 35 rats, une solution d'indométhacine (I-7378, Sigma®) avait été préparée après solubilisation à raison de 0,5 mg/mL dans de l'eau ultra-pure contenant 3% de tween 80 et une sonication aux ultrasons de 3 min. Dans cette étude préliminaire, aucun effet

de l'indométhacine n'avait été observé sur différents indicateurs de la réaction inflammatoire développée dans certaines structures cérébrales à la suite de l'induction du *SE* par la pilocarpine. Cependant, il nous était impossible de conclure de façon fiable sur ces résultats au regard des difficultés liées au mode d'administration intra-péritonéale de l'indométhacine. Dès lors un autre mode d'administration a été privilégié pour les études utilisant de l'indométhacine : la voie rectale.

II.B.1.b. Protocole du traitement à base d'indométhacine

Figures MM5 et MM6 (voir paragraphe III.A.2)

Le protocole de traitement à base d'indométhacine consiste en une première administration par voie rectale à la dose de 10 mg/kg, préparée à partir de suppositoire INDOCID (100 mg, MSD®). La masse d'un suppositoire est de 1643 mg en moyenne. Il contient 100 mg d'indométhacine, ce qui équivaut à administrer pour un rat d'environ 220 g une portion d'environ 36 mg du suppositoire. En fonction des groupes expérimentaux, de l'indométhacine a été administrée par voie rectale tous les jours jusqu'au 8ième jour après *SE* ; la dose d'indométhacine administrée étant diminuée de moitié (5 mg/kg) à partir du 2ième jour. L'indométhacine a toujours été administrée entre 11 h et 12 h.

II.B.1.c. Effets reconnus de l'indométhacine

L'indométhacine est un AINS membre de la classe des acides arylalkanoïque (***Figure MM2***), qui possède des propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et anti-pyrétiques. Sa demi-vie plasmatique varie entre 2,6 h et 11,2 h (d'après le VIDAL® 2003). Les AINS font partie des agents thérapeutiques les plus utilisés dans le monde.

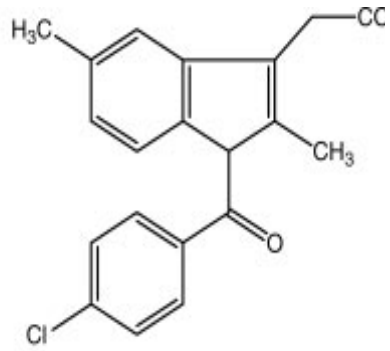


Figure MM2 : Structure chimique de l'indométhacine

L'indométhacine est désignée chimiquement comme étant l'acide 1-(4-chlorobenzoyl)-5-méthoxy-2-méthyl-1H-indole-3-acétique.

Formule chimique : C19H16ClNO4
Poids moléculaire : 357,79

L'ensemble des propriétés attribuées à l'indométhacine serait due à l'inhibition non sélective de cyclo-oxygénases (COX), enzymes impliquées dans la synthèse de différentes prostaglandines et de thromboxane. Principalement deux isoformes de la COX ont été identifiées, une forme constitutive COX-1 et une forme inductible COX-2, dont l'expression est stimulée par les processus inflammatoires. Ces enzymes transforment l'acide

arachidonique, principalement issu des phospholipides membranaires, en prostaglandine H_2, précurseur de toutes les autres prostaglandines.

Les prostaglandines et le thromboxane, dérivés de la prostaglandine H_2, sont impliqués dans de nombreuses réactions biologiques qui conduisent notamment à la sensation de douleur localisée, à l'induction de fièvre et à une inflammation locale.

II.B.2. Administration de la méthylprednisolone

II.B.2.a. Protocole du traitement thérapeutique

Figures MM5 et MM6 (voir paragraphe III.A.2)

Le protocole de traitement à base de méthylprednisolone repose, selon les groupes expérimentaux, en 3 injections i.p. à la dose de 20 mg/kg d'une solution d'hemisuccinate de methylprednisolone (SoluMedrol, Pharmacia®) diluée à raison de 32 mg/mL dans du NaCl à 0,9%. La méthylprednisolone a été injectée une première fois 15 min après l'administration de diazépam (Valium, Roche), une deuxième fois 24 h après et une dernière fois 48 h après. Les injections de méthylprednisolone ont toujours été réalisées entre 11 h et 12 h.

II.B.2.b. Effets reconnus de la méthylprednisolone

La méthylprednisolone est un corticoïde de synthèse de la classe des glucocorticoïdes. Elle exerce un effet anti-inflammatoire exacerbé par rapport aux corticoïdes naturels (cortisol, cortisone) et possède une activité minéralocorticoïde réduite. Sa demi-vie est d'environ 3h30 (d'après le VIDAL® 2003).

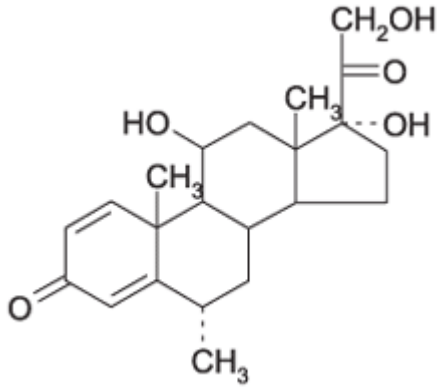


Figure MM3 : Structure chimique de la méthylprednisolone

La méthylprednisolone est désignée chimiquement comme étant un 11 bêta, 17 alpha, 21-trihydroxy-6 alpha-méthylprégna-1,4-diène-3,20-dione 21-(hydrogène succinate).

Les propriétés anti-inflammatoires des glucocorticoïdes seraient principalement dues à l'inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de COX-2.

III. Groupes expérimentaux

III.A. ETUDES REALISEES SUR LES ANIMAUX SOUMIS A UNE EPILEPTOGENESE EXPERIMENTALE INDUITE PAR PILOCARPINE

- EXPERIMENTATION1 -

III.A.1. Caractérisation de la réponse inflammatoire au cours de l'épileptogenèse

Figure MM4

OBJECTIFS PRINCIPAUX :
1) Evaluer l'étendue des dommages histologiques
2) Déterminer les profils d'expression de différents médiateurs moléculaires de l'inflammation dans certaines structures cérébrales au cours de l'épileptogenèse.
3) Caractériser la réponse inflammatoire au niveau cellulaire

Dans ces études, les rats ont été sacrifiés par décapitation après administration de pentobarbital (250 mg/kg ; CEVA) à différents temps après initiation du *SE* : t=8 h (0,3 j) (n=5), t=1 j (n=6), t=2 j (n=6), t=3 j (n=8) et t=7 j (n=3). Pour chacun des groupes, 10 rats ont été préalablement traités à la pilocarpine et sélectionnés selon des critères comportementaux déterminant leur entrée en *SE* (voir paragraphe III.A3 des *Matériels et méthodes*). A chaque temps, les structures cérébrales, néocortex et hippocampe, ont été rapidement prélevées et congelées dans de l'azote liquide. Pour évaluer les effets de l'administration de scopolamine et de diazépam au cours du temps sur le taux des ARNm d'intérêts, des rats témoins (témoins/SD) ont reçu la même dose s.c. de scopolamine et la même dose i.p. de diazépam que les rats pilocarpine (n=5 pour chacun des temps de la cinétique). Enfin, l'hippocampe et le néocortex ont également été prélevés sur des témoins naïfs (TN), sacrifiés à t_0 (n=5). Ces derniers n'ont reçu aucun traitement pharmacologique.

Pour évaluer l'étendue des dommages tissulaires dans certaines structures cérébrales et étudier les événements cellulaires ainsi que les distributions tissulaires de différentes protéines, nous devions travailler sur des tissus cérébraux perfusés. Pour ce faire, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital (250 mg/kg) 8 h (n=3), 1 j (n=3), 3 j (n=5), 4 j (n=3) et 15 j (n=3) après le déclenchement du *SE* induit par pilocarpine (durée 3 h ; D300) et ensuite perfusés par voie trans-cardiaque avec une solution de paraformaldéhyde 4% diluée dans un tampon phosphate à 0,1 M. Pour les temps 8 h, 1 j et 15 j, 7 rats ont été préalablement traités à la pilocarpine et 10 rats pour les temps 3 j et 4 j. Les rats ont été sélectionnés selon des

critères comportementaux déterminant leur entrée en *SE*. Le nombre de rats indiqué est la résultante des rats sélectionnés qui ont survécu et passé le point critique au moment du sacrifice (voir paragraphe III.A.3 des *Matériels et méthodes*). Des TN (n=4) ont également été perfusés au temps t_0. L'ensemble de ces études comprenait 125 rats.

III.A.2. Effets des traitements anti-inflammatoires

- EXPERIMENTATIONS 2a et 2b - *Figures MM5 et MM6*

OBJECTIF PRINCIPAL *:*
Evaluer l'efficacité des traitements anti-inflammatoires sur l'ensemble des variables citées précédemment.

Les rats ont subi 2 h de *SE* induit par l'injection i.p. de pilocarpine à la dose de 375 mg/kg. Cette dose a amélioré la réactivité des rats à la pilocarpine et la diminution de la durée du *SE* a permis de maintenir un taux de survie satisfaisant. Les animaux ont été sacrifiés comme précédemment décrit (voir paragraphe III.A.1 des *Matériels et méthodes*) à différents temps après amorçage du *SE* : t=8 h (0,3 j) (n=18) et t=4 j (n=20). Pour les groupes 8 h et 4 j, 20 et 24 rats ont été respectivement traités à la pilocarpine et sélectionnés (voir paragraphe III.A.3 des *Matériels et méthodes*). Pour le groupe 8 h, des rats ont été traités 10 min par les anti-inflammatoires après arrêt du *SE* par le diazépam : traitement à l'indométhacine (n=4), traitement au méthylprednisolone (n=5) et un traitement cocktail à base d'indométhacine + méthylprednisolone (n=3). Pour le groupe 4 j, des rats ont également été traités aux anti-inflammatoires : traitement à base d'indométhacine (n=5), traitement à base de méthylprednisolone (n=5) et traitement cocktail à base d'indométhacine et de méthylprednisolone (n=5). A chaque temps et pour chaque groupe, le cortex piriforme et l'hippocampe ont été rapidement prélevées et congelées dans de l'azote liquide. Enfin, ces structures ont également été prélevées sur des TN, sacrifiés à t=0 (n=5).

Pour les études sur cerveau perfusé, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital (250 mg/kg) à différents temps : 1 j (n=11), 4 j (n=8) et 15 j (n= 15) suite au déclenchement du *SE* induit par pilocarpine (durée 2 h ; D375), et ensuite perfusés comme précédemment décrits (voir paragraphe III.A.1 des *Matériels et méthodes*). Pour les temps 1 j, 4 j et 15 j, 13, 9 et 27 rats respectivement ont été préalablement traités à la pilocarpine et sélectionnés. Le nombre final de rats indiqué pour chaque groupe est la résultante des rats sélectionnés qui ont survécu au *SE* (voir paragraphe III.A.3). Des TN (n=3) ont également été perfusés au temps t=0. L'ensemble de ces études comprenait 101 rats.

III.A.3. Etude du comportement au cours du *SE* et suivi des rats au cours de l'épileptogenèse.

Le comportement de tous les rats traités à la pilocarpine a été étudié de façon à sélectionner ceux qui ont développé un état de mal cérébral ou *SE*. Après l'injection de scopolamine, les rats ont été placés dans une cage transparente (référence en I.A.1 des *Matériels et méthodes*) à raison de 1 par cage, où ils ont été scrupuleusement observés par les expérimentateurs jusqu'à la fin du *SE*. Après l'injection de pilocarpine, l'observateur a évalué le comportement des rats selon la grille mise au point par Racine en 1972, et a noté le temps d'apparition des différents symptômes.

Grille de comportement selon Racine (1972)

Stades	**Caractéristiques**
Stade 0	Aucune réaction atypique
Stade 1	Ataxie, mâchonnement accru, clonies faciales
Stade 2	Hochements de tête
Stade 3	Clonies des membres antérieurs
Stade 4	Tremblements généralisés, Redressement
Stade 5	Crises généralisées de type tonico-cloniques, Redressement et chute

L'entrée en *SE* est considérée quand l'animal développe des tremblements continus à la suite d'une crise de stade 4 ou de stade 5. Le nombre total de crises de stade 4 et de crises de stade 5 ont été comptabilisés au cours du *SE* pour chaque animal.

Après l'arrêt du *SE* par le traitement au diazépam, les rats présentaient à leur réveil une ataxie prolongée et un comportement caractéristique des animaux en souffrance. Au cours de la période de récupération qui précède le sacrifice des rats, le score de douleur était déterminé chez les rats ayant développé un *SE*. La prise de masse corporelle et les consommations journalières en aliments et en eau ont été mesurées pour chacun des rats, et nous a permis d'établir « le point final » de notre expérimentation en accord avec la réglementation européenne (Décret 86/609) et française (Décret 87/848). Ce « point final » correspondait pour l'ensemble de ces études au point critique à partir duquel la souffrance des animaux atteignait un seuil intolérable, caractérisé par un score de douleur élevé, une réduction importante de la masse corporelle et aucune reprise de la consommation alimentaire pendant plusieurs jours. Nous avons décidé d'éliminer les rats qui n'avaient pas repris de comportement alimentaire au 4ième jour. A ce stade, l'état de dénutrition avancée et de déshydratation importante provoquait généralement la mort du rat. Les rats ayant atteint « le point final » avant la fin de l'expérimentation ont été sacrifiés par décapitation après injection de pentobarbital (250 mg/kg ; CEVA).

III.B. EXPERIMENTATIONS AU COURS DU DEVELOPPEMENT POST-NATAL ET DU VIEILLISSEMENT CHEZ LE RAT

- EXPERIMENTATION 3 -

OBJECTIFS PRINCIPAUX :

1) *Déterminer les profils d'expression génique de l'héparanase dans différentes structures cérébrales au cours du développement post-natal et au cours du vieillissement*
2) *Etudier la distribution tisssulaire de l'héparanase au cours de développement post-natal et au cours du vieillissement*

Les rats âgés de 2 j (P2) (n=8), 5 j (P5) (n=6), 8 j (P8) (n=8), 14 j (P14) (n=5), 21 j (n=5), 3 mois (n=5) et 12 mois (n=5) ont été sacrifiés par décapitation après injection i.p. d'une dose létale de pentobarbital (250 mg/kg ; CEVA). Pour les études sur tissus frais, les structures cérébrales prélevées ont été l'hippocampe, le néocortex et le bulbe olfactif. D'autres rats âgés ont été sacrifiés à P5 (n=5), à 3 mois (n=5) et à 12 mois (n=5) pour les études sur tissus perfusés. L'ensemble de ces études comprenait 55 rats.

IV. Préparations des tissus : procédures *ex vivo*

IV.A. PRELEVEMENTS ET TRAITEMENTS DES TISSUS FRAIS

IV.A.1. Prélèvement des cerveaux et microdissections des structures cérébrales

Les rats ont été sacrifiés par décapitation à l'aide d'une guillotine après injection i.p. d'une forte dose de pentobarbital (250 mg/kg ; CEVA). La tête des rats a été rapidement placée à 4°C dans de la glace, les cerveaux ont été immédiatement extraits de la boîte crânienne et placés sur un plan de travail réfrigéré dans un environnement sans ARNase. Les bulbes olfactifs ont également été prélevés. La microdissection des structures cérébrales d'intérêt a alors été effectuée, comme décrit dans la ***figure MM7***.

IV.A.2. Traitements des échantillons et préparation des ARN totaux

Figure MM8 (voir paragraphe VI des Matériels et méthodes)

IV.A.2.a. Extraction des ARN totaux et purification

Les structures cérébrales congelées ont été broyées à l'aide de pistons, avant d'être homogénéisées dans 280 µL d'eau ultra-pure (UP) (Eurobio) à l'issue de 3 cycles de

congélation/décongélation. Une fraction de 30 µL a été prélevée pour les dosages des protéines. Les acides nucléiques ont été extraits par l'ajout de 750 µL de Tri-Reagent LS (Euromedex) dans les 250 µL d'homogénat restant. L'addition de 200 µL de chloroforme suivie d'une centrifugation (15 min à 4°C; 12000 x g) a permis d'isoler les acides nucléiques. Ceux-ci, situés dans la phase supérieure aqueuse, ont été délicatement récupérés puis traités par 500 µL d'isopropanol (Sigma). Après centrifugation (10 minutes à 4°C; 12 000 g), le surnageant a été éliminé et le culot d'acides nucléiques a été lavé dans 1,5 mL d'éthanol à 75%. Après centrifugation (10 minutes à 4°C ; 12 000 g) et élimination de l'éthanol, les culots ont été rapidement séchés à 37°C puis repris dans 200 µL d'eau UP. Après mélange au Vortex® à vitesse lente, les échantillons ont été congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

Les ARN totaux extraits ont été purifiés par traitement à la Turbo DNA Free (Ambion) pendant 30 min à 37°C afin d'éliminer toute trace éventuelle d'ADN génomique (ADNg). A l'issue de la purification, la concentration en ARN a été déterminée dans une UVette exempte d'ARNase (Eppendorf) par la mesure spectrophotométrique de la densité optique (DO) à 260 nm sur le Biophotomètre (Eppendorf), sachant qu'une unité de DO équivaut à 40 µg/mL d'ARN.

IV.A.2.b. Vérification de la qualité des ARN

La qualité des ARN a été vérifiée systématiquement à l'aide d'un bioanalyseur (2100 Bioanalyzer®, Agilent) par électrophorèse sur une puce d'analyse (Nano LabChip #5065-4476, Agilent).1 µL de solution d'ARN totaux a été prélevé dans chacun des tubes et déposé au fond d'un puit de la puce contenant un mélange de gel-colorant (RNA 6000 Nano gel matrix, Agilent) avec 1 µL de RNA 6000 ladder (#7152, Agilent).

IV.A.2.c. Vérification de l'absence de contamination par de l'ADN génomique

L'absence de contamination par de l'ADN génomique a été vérifiée sur 25 ng d'ARN totaux de l'échantillon purifié, par l'amplification par PCR en temps réel d'une séquence de l'exon V du gène du BDNF. La courbe de fusion obtenue après l'étape de fusion permet l'identification du produit d'amplification à partir de son Tm spécifique. Le volume réactionnel contenu dans les capillaires (utilisés pour le Light Cycler, voir *Méthodes*) comprenait 5 µL de solution concentrée 5 ng/µL d'ARN totaux, et 5 µL de mélange réactionnel réalisé à partir du kit Roche d'amplification. Ce mélange comprenait 2,75 µL d'eau UP, 1 µL de « Hot Start reaction mix » (Roche), 1 µL de solution $MgCl_2$ (3,5 mM final), et 0,25 µL d'amorces spécifiques à la concentration de 10 µM chacune. La séquence des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification est donnée dans le **tableau MMI** (voir

paragraphe VI.B.1 de matériels et méthodes), et les conditions d'amplification sont précisées dans le **tableau MMII** (voir paragraphe VI.B.4 de matériels et méthodes). Pour vérifier le bon déroulement de la réaction de PCR, un standard d'ADNc du BDNF, de concentration connue, est également amplifié. Lorsqu'aucune amplification n'est observée dans l'échantillon, cela signifie que tous les ADN génomiques ont bien été éliminés des échantillons d'ARN totaux par l'étape de purification. Les ARN purifiés peuvent alors servir à la transcription inverse (RT) des ARNm.

IV.B. PREPARATION DES TISSUS PERFUSES

IV.B.1. Fixation des tissus et prélèvement des cerveaux

Les rats ont été anesthésiés par une injection i.p d'une dose létale de pentobarbital sodique (250 mg/kg ; CEVA), puis perfusés par voie intracardiaque, à raison de : 15 mL/min chez les P5 et 30 mL/min pour les autres âges (pompe Masterflex). La perfusion du cerveau par voie intracardiaque est obtenue par incision l'oreillette droite suivie de l'insertion dans l'aorte à la sortie du ventricule gauche de la canule de perfusion et la pose d'une pince pour clamper l'artère abdominale. Les cerveaux ont tout d'abord été rincés de leur sang 1 min (P5) ou 2 min (autres âges) avec un tampon phosphate salin (PBS ; pH~7,4 et température 4°C) à 0,1 M, puis fixés durant 10 min, à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (PF) à 4% préparée dans un tampon phosphate (PB ; pH = 7,4) à 0,1 M final et maintenu à 4°C. Après décapitation, les cerveaux ont été délicatement retirés de la boîte crânienne, et à nouveau fixés dans une solution de PF à 4% 2 heures et enfin déshydratés durant 48 heures dans une solution de saccharose à 25%, préparée dans du PB à 0,1 M final pour optimiser leur cryo-conservation. Les cerveaux ont été ensuite congelés dans de l'isopentane à -40°C pendant 1 minute et 10 secondes, placés quelques minutes sur de la carboglace avant d'être conservés à -80°C.

IV.B.2. Coupe des cerveaux perfusés

Les cerveaux perfusés ont été coupés en tranche de 30 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat (Leica CM1850) dans la région de l'hippocampe (coordonnée interaurale (IA) +6,70 mm à +3,80). Le pas entre chaque coupe est de 30 µm ; toutes les coupes étant récupérées. Les coupes ont été placées dans des boîtes de 24 puits (Falcon), chaque puits contenant 1 mL de PBS 0,1 M. Tous les 240 µm, une coupe a été prélevée et montée sur lame gélatinée (1% de gélatine) pour une coloration au crésyl-violet qui permet non seulement de vérifier la qualité du tissu perfusé mais également le repérage des structures anatomiques (pas

entre chacune des coupes prélevées ~180-240 µm). Les autres coupes ont été transférées dans une solution d'anti-congélant contenant 30% de glycérol 98% (Prolabo), 30% d'éthylène glycol (Prolabo) et 10% de tampon F (solution de NaH_2PO_4 et de NaOH). Les boîtes de 24 puits ont par la suite été transférées dans une chambre froide à -20°C.

EXPERIMENTATION *IN VITRO*

V. Cellules en culture

- EXPERIMENTATION 4 -

OBJECTIFS PRINCIPAUX :

1) *Déterminer les profils d'expression du gène de l'héparanase au cours de la différenciation neuronale dans le modèle des cellules PC12 traités au NGF.*
2) *Déterminer la distribution protéique de l'héparanase dans les cellules PC12 à différents stades de leur différenciation*

V.A. CONDITIONS DE CULTURE

La lignée cellulaire de phéochromocytome de rat PC12 a été utilisée dans cette expérimentation *in vitro*. Les cellules ont été maintenues en culture à 37°C dans des flacons de 175 cm² (Falcon) dans une atmosphère humidifiée à 90% contenant 95% d'air ambiant et 5% de CO_2. Le milieu de culture utilisé est le milieu de culture classique de Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Eurobio # CM1DME60K) auquel a été ajouté 7% de sérum de cheval inactivé par la chaleur, 7% de sérum bovin nouveau-né, et des antibiotiques (pénicilline à 80 U/mL et streptomycine à 80 mg/mL) (Eurobio). Ce milieu de culture, appelé milieu de culture complet des PC12 (MCPC12), a été changé tous les 2 jours jusqu'à confluence.

V.B. PREPARATION ET TRAITEMENTS DES CELLULES

Les cellules PC12 ont été récoltées après dislocation mécanique, comptées en utilisant un hémacytomètre et ensuite ensemencées dans du MCPC12 à la densité de 300 cellules/mm² dans des plaques de culture de cellules de 6 puits traités au collagène-I (BD Biocoat). Trois jours après, les cellules ont été traités avec 50 ng/mL de NGF de souris (Promega) avec 1% de sérum de cheval inactivé par la chaleur et les antibiotiques dans le milieu de culture. Les

cellules ont été collectées dans deux des puits le jour-même (J0), le lendemain (J1) et 3 jours après (J3) le traitement par le NGF après ajout de 1 mL de Trizol (Euromedex). L'extraction des ARN totaux a été réalisée par ajout de 200 µL de chloroforme. Les étapes d'extraction, de purification et de vérification de non contamination en ADN génomique suivent les mêmes procédures que celles de la préparation des ARN extraits sur pièce tissulaire (voir paragraphe IV.A.2 des *Matériels et méthodes*). Une solution de paraformaldéhyde à 4% préparée dans du tampon PB à 0,1 M a été ajoutée dans deux des puits pour les études immunocytochimiques. Les deux derniers puits ont servi à vérifier les effets de la densité cellulaire sur les paramètres étudiés.

METHODES

VI. Dosage des ARNm par RT étalonnée et PCR en temps réel

Figure MM8

VI.A. La reaction de transcription inverse (reverse transcription ou RT)

VI.A.1. L'étalonnage de la RT

La méthode d'étalonnage de la réaction de transcription inverse (RT) utilisée dans ces études a fait l'objet d'un dépôt de brevet international (Brevet International n°WO2004.092414 enregistré le 17 avril 2004 déposé aux noms du CNRS et de l'UCB Lyon 1 par les co-inventeurs Laurent BEZIN et Anne MORALES). Cet étalonnage est fondé sur l'ajout d'une quantité connue d'un ARN de synthèse possédant une queue polyA (SmRNA) dans le volume réactionnel final de chaque échantillon où s'opère la RT. Cet ARN de synthèse joue le rôle d'étalon externe hétérologue non-compétitif car: i) il possède une séquence nucléotidique distincte de toutes celles référencées dans les banques de données, tout génome confondu, et ii) la RT de cet ARN de synthèse n'interfère pas avec celles des ARN messagers endogènes aussi bien chez l'homme, la souris, le rat, c-elegans, le gamare et la drosophile. Cette méthode d'étalonnage nous donne accès de façon fiable au rendement de la RT par le SmRNA dans chacun des tubes. Ce rendement sera par la suite utilisé pour normaliser l'ensemble des réactions de RT réalisées dans chacun des tubes.

VI.A.2. La réaction de RT

Afin de cibler exclusivement les ARNm contenus dans la solution d'ARN totaux, une amorce polydT$_{15}$ a été utilisée pendant la réaction de RT. Cette réaction est effectuée dans un volume de 20 µL, contenant 12 µL de solution d'ARN totaux purifiés ramenés à 41,7 ng/µL (soit 500 ng d'ARN totaux), et 8 µL d'un pré-mélange réactionnel comprenant: 100 U/µL de M-MLV Reverse Transcriptase RNAse H minus (Promega), le tampon de l'enzyme, 0,5 mM de chacun des dNTP (Promega), 1 µg d'amorces polydT$_{15}$ et 80 pg de SmRNA. Les tubes utilisés étaientt des tubes à faible pouvoir de rétention (Axygen). Les RT de tous les échantillons correspondant à une même structure cérébrale ont été effectuées en même temps à partir d'un pré-mélange réactionnel identique. Après une incubation de 9 min à 42°C, la transcriptase inverse a été inactivée par la chaleur (15 min à 70°C). Puis, les solutions d'ADN complémentaires (ADNc) obtenues pour chaque échantillon ont été diluées dans 80 µL d'eau ultra-pure (Eurobio) et conservées en fractions aliquote de 5 µL dans des tubes à faible pouvoir de rétention (Axygen) à -25°C.

VI.B. AMPLIFICATION QUANTITATIVE DES ADNC D'INTERET PAR PCR EN TEMPS REEL

VI.B.1. Choix des amorces

Les séquences des couples d'amorces sens et anti-sens spécifiques ont été construites à l'aide du logiciel "Primer 3" (NIH; www.basic.nwu.edu) ou à l'aide du logiciel de la « Universel Probe Librery » (Roche Diagnostics). Les amorces ont ensuite été synthétisées par Invitrogen (***Tableau MMI***).

VI.B.2. Principe de la réaction de PCR en temps réel

Les ADNc d'intérêt ont été amplifiés par la technique de PCR en « temps réel » à l'aide du thermocycleur Lightcycler™ (Roche). Ce thermocycleur permet une réaction de PCR rapide, très sensible et hautement reproductible. L'utilisation de fins capillaires en verres de borosilicates résistants aux hautes températures permet une bonne homogénéité des variations de température sur l'ensemble du volume réactionnel. Un cycle de PCR est constitué d'une étape de dénaturation à 95°C des ADN double brin en ADN mono-brin, d'une étape d'hybridation à 60°C des amorces spécifiques de la séquence cible à amplifier et d'une étape d'élongation à 72°C de l'ADN grâce à la Taq polymérase résistante aux hautes températures et aux desoxyribonucléotides libres dans le volume réactionnel. Pour le suivi de

l'accumulation de l'ADNc amplifié cycle par cycle, un agent intercalant, le SYBR Green I ($\lambda_{excitation}$ = 494 nm; $\lambda_{émission}$ = 521 nm), est introduit dans le milieu réactionnel. Il présente la propriété de n'émettre une fluorescence qu'une fois intercalé dans le petit sillon de l'ADN. La fluorescence est lue à la fin de chaque étape d'élongation ce qui permet de la corréler à la quantité d'ADN double brin accumulé dans le milieu réactionnel. Le logiciel de traitement des données associé au Lightcycler™ permet une analyse de la réaction de PCR dans sa phase exponentielle par la méthode du « maximum de la dérivée seconde », et fournit pour chaque échantillon le « point de sortie » (PS), exprimé en « cycles de PCR », dont la valeur est inversement proportionnelle à la concentration initiale d'ADNc de l'échantillon. Par la méthode du maximum de la dérivée seconde, ce point de sortie correspond au cycle au cours duquel l'efficacité de la PCR était la plus importante ; il est donc par définition contenu dans la phase d'amplification quantitative (exponentielle) de la PCR. Ce « point de sortie » est ensuite utilisé pour comparer la quantité d'ADNc contenue dans le milieu réactionnel de chacun des échantillons à l'issue de la RT. Une gamme d'étalonnage réalisée pour un ADNc donné nous permet en effet d'établir une correspondance entre le PS et la quantité d'ADNc contenue dans le milieu réactionnel au début de l'amplification.

VI.B.3. Obtention de la gamme étalon

La réaction d'amplification a été étalonnée pour chaque ADNc ciblé pour des concentrations allant de 1 à 10^8 copies. Les points de sortie correspondant devaient encadrer ceux des échantillons à doser. Pour chaque ADNc ciblé, la droite de régression linéaire obtenue d'après la gamme étalon permet de corréler le PS au nombre de copies initialement contenu dans chaque échantillon.

Pour un gène donné, la gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution purifiée et de concentration connue de l'ADNc ciblé, appelé aussi « standard pur », qui subit une série de dilutions en cascade au 10ème, dans de l'eau UP, pour obtenir une gamme entre 10 et 10^8 copies. Chaque point de dilution, appelé « standard dilué », est choisi de façon à ce que l'ensemble des points de la gamme encadre le « point de sortie » des échantillons à doser. Après dosage du standard pur, la concentration en ng/µL est convertie en nombre de copies/µL grâce à la valeur de la masse molaire et du nombre d'Avogadro. L'équation de la droite étalon, obtenue à partir de l'amplification des ADNc spécifiques contenus dans chaque point de gamme, permet i) de mettre en relation le « point de sortie » d'un échantillon donné avec le nombre de copies d'ADNc présentes dans celui-ci avant la réaction de PCR et ii) de calculer le coefficient d'efficacité de la réaction de PCR (compris communément entre 1,6 et 2) à partir de son coefficient directeur. L'équation de la droite étalon est la suivante :

Point de sortie = coefficient directeur x nombre de copies + ordonnée à l'origine

La préparation du « standard pur » est réalisée sur un thermocycleur conventionnel (PCR Express ; Hybaid) à l'aide du couple d'amorces identique à celui utilisé sur Lightcycler™ et de deux types d'ADN polymérase : la HotStar Taq polymérase (HST) (Qiagen) qui amplifie l'ADNc cible et la Proof Star DNA polymérase (Qiagen) qui corrige, grâce à son activité 3' exonucléase, les erreurs de réplication produites par la HST, afin d'obtenir un « standard pur » pour lequel les erreurs de réplication sont minimisées. Le milieu réactionnel contenait alors 300 µM de dNTP, 0,5 µM de chacune des amorces spécifiques du produit de RT d'intérêt, 2 µL d'ADNc obtenus après RT d'ARNm extraits à partir des différentes structures du tissu cérébral et enfin 5 U de HST. Après une incubation de 13 min à 95°C, la Proof Star DNA polymerase (0,05 U) est ajoutée, suivie d'une nouvelle incubation à 95°C durant 2 min. L'ADNc cible a alors été amplifié pendant 30 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C durant 10 s, une étape d'hybridation de 60°C durant 60 s et enfin, une étape d'élongation à 68°C durant 25 s. Après l'étape d'élongation finale (68°C ; 5 minutes), le produit de la PCR a été purifié à l'aide de la trousse de purification « PCR MiniElute » (Qiagen). Le produit d'amplification a été dosé par spectrophotométrie dans une UVette et sa taille a été vérifiée après migration électrophorétique dans un gel d'agarose à 1,5%.

VI.B.4. Amplification des ADNc d'intérêt

Les ADNc amplifiés ont été ceux des ARNm du « SmRNA », de l'IL-1β, de l'IL-1 Ra, de l'IL-1 R, du TNF-α, de l'IL-6, de MCP-1, de MIP-1α, de MIP-1β et de l'héparanase. Les conditions d'amplification par PCR en "temps réel" des ADNc d'intérêt sont présentées dans le **tableau MM2**. Les séquences des amorces et les conditions d'amplification du ScDNA sont protégées par le brevet WO2004.092414. Pour chaque couple d'amorces, nous avions sélectionné la trousse d'amplification la plus performante (meilleure efficacité de PCR). Les ADNc des ARNm du SmRNA, de l'IL-1 R, du TNF-α, de l'IL-6, de MCP-1, de MIP-1α, et de MIP-1β ont été amplifiés à l'aide de la trousse QuantiTect SYBR Green I (Qiagen), avec un volume réactionnel de 20 µL dans le tube capillaire contenant 5 µL d'ADNc de l'échantillon, 4 µL d'eau UP, 1 µL d'amorce sens et d'amorce anti-sens à la concentration de 10 µM chacune et 10 µL du QuantiTect Master Mix 2X. Les ADNc des ARNm de l'IL-1β, de l'IL-1 Ra et de l'héparanase ont été amplifiés à l'aide de la trousse LC FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) avec un volume réactionnel de 10 µL pour chacun des tubes capillaires contenant 5 µL d'ADNc de l'échantillon, 2,75 µL d'eau UP, 0,25 µL d'amorces spécifiques sens et anti-sens à la concentration de 10 µM chacune, 1 µL de MgCl2 à la concentration finale de 3,5 mM et 1 µL de HotStart reaction mix 10X.

L'identification des ADNc amplifiés est permise grâce à l'étape de fusion réalisée après le dernier cycle d'amplification. Cette étape consiste en la dénaturation de tous les ADNc présents dans le milieu réactionnel par une montée rapide de température à 95°C à la vitesse de 20°C/s. Puis, la température est descendue à la même vitesse jusqu'à une température de 10°C supérieure à la température d'hybridation pendant 20 s pour permettre l'hybridation de tous les ADNc présents. Enfin, la température est très lentement élevée à la vitesse de 0,1°C/s accompagnée d'une lecture de fluorescence en continue. La décroissance de la fluorescence associée à la dénaturation très lente des ADNc permet d'obtenir la température de fusion, qui est spécifique d'un ADNc donné. Quand la PCR n'engendre qu'un seul produit d'amplification, la dérivée de courbe de fusion ne montre qu'un seul pic.

VII. Dosage des protéines IL-1β et IL-1 Ra et immuno-emprunte de l'héparanase

VII.A. EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES SUR HOMOGENATS TISSULAIRES

Un tampon de lyse 2X incomplet a été préparé contenant 2,42 g de tris méthyl-amino-méthane (Euromedex) et 500 µL d'EDTA 0,5 M à pH 8,0 (Euromedex) dans 500 mL d'eau UP. Le pH de ce tampon a été ajusté à 7,5 avec une solution de HCl 6 M. Le Nonidet P-40 (Roche) (0,06 µL) a été ajouté à un volume de 30 µL de tampon de lyse 2X ainsi que 0,1% de DTT (Euromedex) et 0,25 µL d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC *pour protease inhibitor cocktail*) (Sigma) pour constituer le tampon de lyse 2X complet. Les 30 µL d'homogénats tissulaires décongelés ont été incubés pendant 20 min à 4°C en présence de 30 µL de tampon de lyse 2X complet. Le surnageant a été prélevé (~40 µL). 5 µL de surnageant ont été prélevés et mélangés à 95 µL d'eau UP. Les 35 µL d'extrait de protéines restants ont été congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

VII.B. DOSAGE DES PROTEINES SOLUBLES TOTALES PAR LA METHODE DE L'ACIDE BICINCHONINIQUE.

Pour le dosage des protéines solubles totales, nous avons utilisé la trousse de réactifs fournie par Sigma à base d'acide bicinchoninique. Nous avons préalablement préparé une gamme étalon de concentration d'albumine de sérum bovin (BSA pour *Bovin Serum Albumin*). 25 µL de l'échantillon dilué au 20ième ou du point de gamme ont été mélangés à 500 µL de réactif à base d'acide bicinchoninique, et incubés 15 min à 60°C dans un bain-

marie. La DO a ensuite été mesurée à 560 nm par lecture au spectrophotomètre (Biophotomètre Eppendorf).

VII.C. DOSAGE ELISA DE L'IL-1β ET DE L'IL-1 RA

Les dosages des protéines IL-1β et IL-1 Ra ont été réalisés par la technique ELISA en utilisant les trousses de chez Biosource (N° catalogue #KRC0011 pour l'IL-1β et KRC0712/KRC0711 pour l'IL-1 Ra) en suivant les instructions du fournisseur. La technique ELISA permet une détection spécifique des protéines cibles par la mise en « sandwich » de l'antigène entre deux anticorps spécifiques, l'un fixé au fond du puits et l'autre ajouté dans le milieu réactionnel après dépôt des échantillons de protéines. Une biotine a été conjuguée au second anticorps et permet une révélation par la peroxidase conjuguée à la streptavidine. La densité optique a été mesurée à 450 nm pour chacun des puits contenant soit un standard, soit un point de gamme, soit un échantillon de concentration connue en protéines totales. Les résultats sont exprimés en pg de cytokine IL-1β ou IL-1 Ra par mg de protéines solubles totales.

VII.D. IMMUNO-EMPRUNTE DE L'HEPARANASE

Pour chacun des échantillons, 50 µg (pour les tissus) et 10 µg (pour les cellules PC12) de protéines totales ont été assemblées. Des quantités égales de protéines rassemblées (40 µg pour les tissus et 10 µg pour les cellules PC12) ont été ensuite séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à la concentration de 12% (29 :1), et ensuite transferées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été saturées pendant une heure à température ambiante à l'aide d'une solution tampon Tris contenant 0,1% de Tween 20 et 5% de lait écrémé. Tous les rinçages sont réalisés à l'aide d'une solution tampon Tris. Les membranes ont ensuite été successivement incubées dans des solutions d'avidine et de biotine selon les recommandations des fabriquants (Avidin Biotin blocking kit; Vector). Ensuite, les membranes ont été séquentiellement incubées une nuit à 4°C en présence de l'anticorps polyclonal anti-héparanase (Covalab) dilué à 1/100 dans une solution de tampon Tris contenant 0,1% de Tween 20 et 1% de lait écrémé, puis, après des rinçages rapides, 2 heures à température ambiante en présence de l'anticorps biotinylé anti-IgG de lapin (AP187B; Chemicon) dilué à 1/1000 dans une solution de tampon Tris contenant 0,1% de Tween 20 et 1% de lait écrémé. Enfin, après incubation 1 heure à temperature ambiante dans le complexe avidine-biotine-péroxydase (Vectastain Elite ABC kit; Vector), le signal sur les membranes a

été révelé par dépôt d'une solution de 3',3-diaminobenzidine (DAB) (Vector). Après rinçages à l'eau du robinet, les membranes ont été scannées et analysées pour la quantification à l'aide d'un système d'analyse d'image (Visilog 6.3; Noesis). Pour chaque bande, la densité optique et la surface de marquage ont été mesurées. La quantité de protéines a ensuite été calculée en multipliant la densité optique et la surface et le résultat a été exprimé en unités arbitraires (U.A).

VIII. Etudes histologiques

VIII.A. COLORATION AU CRESYL VIOLET ET RECALAGE ANATOMIQUE

Tous les 240 µm, une coupe a été marquée au crésyl violet pour repérer grâce à l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (4ième édition Academic Press 1998) les structures anatomiques, les situer le long de l'axe rostro-caudal et recaler ainsi anatomiquement tous les cerveaux. La coloration au crésyl violet marque les corps de Nissl, agrégats de reticulum endoplasmique granuleux des corps cellulaires. Le recalage anatomique réalisé grâce à la coloration au crésyl violet permet de sélectionner des coupes du même plan anatomique pour les comparaisons entre les différents cerveaux récoltés.

Les coupes sont montées sur des lames gélatinées à 1%. Une fois sèches, elles sont plongées dans une solution de crésyl-violet-acétate (Crésyl-violet, Merck ; à 0,5% poids/volume, CH_3CO_2Na 12,2 mM, pH = 3,5) durant 5 min, déshydratées dans des bains successifs d'éthanol respectivement à 50% (1 minute), 70% (1 minute), 95% (10 minutes) et 100% (6 minutes), puis « délipidées » dans un bain de xylène (10 minutes) avant montage dans le milieu histologique DPX (Fluka).

VIII.B. COLORATION AU FLUOROJADE B

Une coupe coronale a été colorée au Fluorojade B (IA= +5,70 mm selon l'atlas Paxinos et Watson, 1998) pour chaque cerveau de chaque groupe. La coloration au Fluorojade B marque les neurones en dégénérescence [225,253]. Les coupes ont été montées sur lames SuperFrostPlus (Menzel-Glaser) avant d'être immergées dans des bains successifs d'éthanol à 80% et NaOH à 1% pendant 5 min, d'éthanol à 70% pendant 2 min, d'eau distillée pendant 2 min et enfin de permanganate de potassium à 0,06% sous agitation pendant 10 min. Après rinçage à l'eau distillée, les lames ont été plongées pendant 20 min dans une solution de Fluorojade B à 0,0004% (Chemicon) préparée dans de l'acide acétique à 0,1%. Les lames ont

été placées au cours de l'incubation dans l'obscurité. Les lames ont ensuite été rapidement rincées dans de l'eau distillée (3 fois 1 minute) et égouttées avant d'être complètement séchées pendant 10 min à 50°C. Enfin, les coupes ont été placées dans un bain de xylène 1 minute puis montées dans un milieu DPX (Fluka).

Les coupes marquées ont été observées à l'aide d'un microscope (Leica TCS SP2 ; Leica microsystèmes SA). Le Fluoro-Jade B a été excité avec une longueur d'onde de 480 nm et le logiciel d'analyse, couplé au microscope, a récupéré la fluorescence émise, à l'aide d'un filtre fluorescéine/FITC, à la longueur d'onde de 525 nm (vert).

VIII.C. DETECTIONS IMMUNOHISTOCHIMIQUES

VIII.C.1. Production de l'anticorps anti-héparanase de rat

D'abord, nous avons sélectionné de courtes séquences peptidiques (~15 aa) dans la séquence de l'héparanase (GenBank, N° Accession : Q71RP1), correspondant aux domaines de liaison de la sous unité de 50 kDa de cette enzyme à son substrat, les chaînes d'HS. Les séquences sélectionnées sont celles comprises entre Tyr^{149} et Ser^{161}, désignées comme **peptide I :** CYQREKNSTYSRS, et celles comprises entre Arg^{273} et Ser^{284}, désignées comme **peptide II :** CRSFLKAGGEVIDS, auxquelles a été ajouté un résidu cystéine en position N-terminal. Ensuite ces peptides ont été synthétisés (Covalab) et utilisés pour immuniser un lapin et produire ainsi un anticorps polyclonal dirigé contre eux. L'anticorps a été purifié sur colonnes d'affinité à partir des prélèvements de sérum sur ce lapin.

MLRPLLLLWLWGRLGALTQGTPAGTAPTKDVVDLEFYTKRLFQSVSPSFLSITIDASLAT
DPRFLTFLGSPRLRALARGLSPAYLRFGGTKTDFLIFDPNKEPTSEERSYWQSQDNNDIC
GSERVSADVLRKLQMEWPFQELLLLREQYQ**REFKNSTYSRS**SVDMLYSFAKCSRLDLIFG
LNALLRTPDLRWNSSNAQLLLNYCSSKGYNISWELGNEPNSFWKKAHISIDGLQLGEDFV
ELHKLLQKSAFQNAKLYGPDIGQPRGKTVKLL**RSFLKAGGEVIDS**LTWHHYYLNGRVATK
EDFLSSDVLDTFILSVQKILKVTKEMTPGKKVWLGETSSAYGGGAPLLSDTFAAGFMWLD
KLGLSAQLGIEVVMRQVFFGAGNYHLVDENFEPLPDYWLSLLFKKLVGPKVLMSRVKGPD
RSKLRVYLHCTNVYHPRYREGDLTLYVLNLHNVTKHLKLPPPMFSRPVDKYLLKPFGSDG
LLSKSVQLNGQTLKMVDEQTLPALTEKPLPAGSSLSVPAFSYGFFVIRNAKIAACI

Figure MM9 : Séquence peptidique de 536 acides aminés (Q71RP1) de l'héparanase du rat (*rattus norvegicus*)

Après une courte séquence dans la région N-terminale qui pourrait correspondre à un peptide de signalisation, nous trouvons la séquence correspondant à la sous-unité de 8 kDa (en surlignage rouge). La séquence surlignée en jaune correspond, quant à elle, à la sous-unité de 50 kDa et la séquence surlignée en gris correspond de ce fait au peptide intermédiaire coupé. Les acides aminés écrits et encadrés en rouge correspondent aux domaines de liaison de la sous-unité de 50 kDa de l'héparanase aux chaînes d'HS. Nos peptides dérivés de la séquence de l'héparanase sont indiqués **en gras**.

VIII.C.2. Détection immunohistochimique et révélation à la péroxydase

VIII.C.2.a. Sur coupes flottantes sans phase de démasquage antigénique à l'acide citrique

Les coupes flottantes perfusées correspondant au plan anatomique IA=+5,70 mm (Paxinos and Watson, 1998) ont été récupérées de l'anti-congelant, rincées abondamment avec du PBS et placées une nuit à 4°C dans un bain de PBS 0,1 M (PBS) avec 0,5% de triton X100 (PBS-T 0,5%) afin de perméabiliser le tissu et faciliter la pénétration des anticorps. Les coupes ont ensuite été incubées pendant 2 heures à température ambiante (TA) dans du PBS avec 0,3% de triton X100 et 2% de sérum d'âne non immum (PBS-T-D) pour permettre la saturation des sites antigéniques non spécifiques qui pourraient être reconnus par l'anticorps secondaire. Les biotines endogènes ont été saturées à l'aide de la trousse de réactifs d'Abcys N°SP2001 selon les recommandations du fournisseur. Après un rinçage de 5 min dans du PBS, les coupes ont été incubées, une nuit à TA sous agitation, en présence de l'anticorps spécifique de l'antigène d'intérêt (anticorps primaire) dilué dans du PBS-T-D. La liste des anticorps primaires utilisés et les conditions d'incubation sont récapitulées dans le **tableau MMIII**. Le lendemain, les coupes ont été abondamment rincées dans du PBS, et incubées une nuit à 4°C sous faible agitation en présence d'anticorps secondaires conjugués à la biotine dilués dans du PBS-T-D ; ces anticorps secondaires sont dirigés contre les immunoglobulines G (IgG) de l'espèce ayant servi à la production de l'anticorps primaire utilisé précédemment. La liste des anticorps secondaires utilisés et les conditions d'incubation sont récapitulées dans le **tableau MMIII**. Le jour suivant, les coupes ont été rincées abondamment dans du PBS et incubées 15 min dans une solution 0,1% de H_20_2 30% diluée dans du PBS-T. Cette étape permet de saturer les péroxydases endogènes. Après une série de rinçages dans du PBS, les coupes ont été incubées pendant 1 h à TA en présence du complexe avidine-biotine-péroxydase (Kit Vectastain Elite ABC peroxidase standard, VPK-6100, Vector), dilué au 1/1000 dans du PBS. Ce complexe va se fixer aux biotines non-saturées dans le tissu, celles conjuguées aux anticorps secondaires. Après rinçage dans du PBS, la révélation a été réalisée par l'incubation des coupes pendant environ 6 à 10 min dans une solution de 3',3-diaminobenzidine (DAB) (D-4293, Sigma fast), contenant du H_2O_2. La péroxydase complexée avec l'avidine va réagir avec la solution de DAB/H_2O_2 et former un précipité brun. Les coupes ont alors abondamment été rincées dans du PBS, puis montées sur lames SuperFrostPlus (Menzel-Glaser) dans une solution diluée de PBS. Elles ont ensuite été déshydratées dans des bains successifs d'éthanol à 50% (1 min), à 70% (1 min), à 95% (2x5 min) et à 100% (2x3 min), et enfin « délipidées » dans des bains de xylène (2x5 min). Après le dernier bain de xylène, elles ont été montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage histologique DPX (Fluka).

VIII.C.2.b. Sur coupes montées sur lames avec phase de démasquage antigénique à l'acide citrique

Les coupes flottantes de cerveaux perfusés correspondant au plan anatomique IA=+5,70 mm (Paxinos and Watson, 1998) ont été récupérées de l'anti-congelant, rincées abondamment avec du PBS et placées une nuit à 4°C dans du bain de PBS 0,1 M (PBS). Les coupes ont été montées sur lames « SuperFrostPlus » (Menzel-Glaser) et abondamment rincées dans du PBS. Une solution d'acide citrique (Target Retrival Solution N°S1700 ; DAKO) à pH 6,1 a été chauffée au bain-marie à 98°C. Les lames ont été plongées dans cette solution pendant 20 min. Ce traitement des coupes permet un démasquage des sites antigéniques par linéarisation des séquences peptidiques. Puis, les coupes ont été incubées pendant 2 heures à température ambiante (TA) dans du PBS avec 0,3% de triton X100 et 2% de sérum d'âne non immun (ou sérum normal d'âne) (PBS-T-D). Les biotines endogènes ont été saturées à l'aide de la trousse de réactifs d'Abcys N°SP2001 selon les recommandations du fournisseur. Après un rinçage de 5 min dans du PBS, les coupes ont été incubées, une nuit à TA dans une chambre humide, en présence d'une solution d'anticorps primaire et recouvertes par des « hybrislips » (Sigma, 2365912-100EA). La liste des anticorps primaires utilisés et les conditions d'incubation sont récapitulées dans le **tableau MMIII**. Le lendemain, les coupes ont été abondamment rincées dans du PBS, et incubées une nuit à 4°C dans une chambre humide en présence de l'anticorps secondaire couplé à la biotine qui est spécifique de l'anticorps primaire précédemment utilisé. La liste des anticorps secondaires utilisés et les conditions d'incubation sont récapitulées dans le **tableau MMIII**. Le jour suivant, les coupes ont été rincées abondamment dans du PBS et incubées 15 min dans une solution contenant 0,1% de H_20_2 à 30% dans du PBS-T. Ensuite, les étapes ont été les mêmes que celles précédemment décrites (voir paragraphe VIII.C.2.a des *Matériels et méthodes*).

VIII.C.3. Double détection par immuno-fluorescence

Les coupes flottantes des cerveaux perfusés correspondant au plan anatomique IA=+5,70 mm (Paxinos and Watson, 1998) ont été récupérées de l'anti-congelant, rincées abondamment dans du PBS et placées une nuit à 4°C dans du PBS-T 0,5%. Le lendemain, les coupes ont été incubées pendant 2 heures à TA dans du PBS-T-D contenant 2% de sérum d'âne, puis une nuit et un jour à 4 °C sous faible agitation, en présence d'une solution contenant les deux anticorps primaires spécifiques des deux antigènes d'intérêt, préparée dans du PBS-T-D. La liste des anticorps primaires utilisés et les conditions d'incubation sont précisées dans le **tableau MMIII**. A partir du jour suivant, toutes les étapes de la détection par immunofluorescence ont été réalisées à l'abri de la lumière. Les coupes ont été abondamment rincées et incubées sous faible agitation durant une nuit à 4°C puis 2 h à TA en

d'une solution préparée dans du PBS-T-D contenant les deux anticorps secondaires spécifiques des anticorps primaires précédemment utilisés ; les deux anticorps secondaires sont couplés à des fluorochromes différents (Alexa-488 ou Alexa-633). Après rinçages dans du PBS, les coupes ont été montées sur lames « SuperFrostPlus » (Menzel-Glaser), séchées à TA et montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage histologique spécifique pour conserver la fluorescence (ProLong Gold Antifade reagent, Molecular Probes, P36931). Ce milieu de montage contient du DAPI, un marqueur du noyau qui émet une fluorescence dans le bleu après stimulation laser.

VIII.C.4. Validation de la spécificité de l'anticorps

Les coupes flottantes perfusées ont été récupérées de l'anti-congelant, rincées abondamment dans du PBS et placées durant une nuit à 4°C dans un bain de PBS-T 0,5%. Le lendemain, les coupes ont encore été abondamment rincées et les peptides immunogènes (**peptide I** et **peptide II**) ont été solubilisés dans de l'eau désionisée à pH neutre. En effet, d'après leur composition en aa, la solubilisation de ces peptides dans de l'eau à pH neutre n'est pas problématique (+ de 25% de chaines latérales chargées et moins de 50% de chaines latérales hydrophobes). Différentes solutions ont été préparées dans du PBS-T-D et mélangées sous faible agitation pendant 1 nuit à 4°C et 2 h à TA :

- anticorps anti-héparanase (Covalab) dilué au 1/3000,
- anticorps anti-héparanase (Covalb) dilué au 1/3000 et le peptide I à la concentration finale de 10 µM
- anticorps anti-héparanase (Covalab) dilué au 1/3000 et le peptide II à la concentration finale de 10 µM
- anticorps anti-héparanase (Covalab) dilué au 1/3000 et les peptides I et II tous deux présents à la concentration finale de 10 µM

La dilution de l'anticorps primaire anti-héparanase a été déterminée d'après une étude préalable qui montrait que ce point de dilution correspondait au seuil de détection de l'héparanase par microscopie confocale. Les coupes ont préalablement été incubées 2 h à TA dans du PBS-T-D, puis dans les différentes solutions préparées d'anticorps +/- peptides pendant 1 nuit sous faible agitation à TA. A partir du jour suivant, toutes les étapes de la détection par immunofluorescence ont été réalisées à l'abri de la lumière. Les coupes ont été abondamment rincées et incubées sous faible agitation durant une nuit à 4°C puis 2 h à TA en présence d'un anticorps anti-IgG de lapin obtenu chez l'âne et couplé au fluorochrome Alexa-488 (Molecular Probes, A-21206) dilué au 1/1500 dans du PBS-T-D. Ensuite, les étapes ont été les mêmes que celles précédemment décrites (voir paragraphe VIII.C.3 des *Matériels et méthodes*).

VIII.C.5. Détection *in situ* des chaînes de sulfate d'héparane liant l'héparanase

Pour détecter les chaînes d'HS, nous avons fait synthétiser le peptide I (voir paragraphe VIII.C.1 des *Matériels et méthodes*) et ajouter une biotine à son extrémité C-terminal (Covalab). La séquence du peptide I correspond à celle du domaine de liaison aux chaînes d'HS sur la séquence de l'héparanase.

Les coupes flottantes des cerveaux perfusées correspondant au plan anatomique IA=+5,70 mm (Paxinos and Watson, 1998) ont été récupérées de l'anti-congelant, et rincées abondamment avec du PBS et placées une nuit à 4°C dans du PBS 0,1 M (PBS) avec 0,5% de triton X100 (PBS-T 0,5%). Les coupes ont ensuite été incubées pendant 2 heures à température ambiante (TA) dans du PBS avec 0,3% de triton X100 et 2% de sérum non immum d'âne (PBS-T-D). Les biotines endogènes ont été saturées à l'aide de la trousse de réactifs d'Abcys N°SP2001 selon les recommandations du fournisseur. Après un rinçage de 5 min dans du PBS, les coupes ont été incubées, une nuit à TA sous agitation, en présence une solution de peptide I diluée dans de l'eau UP (Eurobio) à la concentration finale de 10 µM. Le jour suivant, les coupes ont été rincées abondamment dans du PBS et incubées 15 min dans une solution contenant 0,1% de H_20_2 à 30% diluée dans du PBS-T. Après une série de rinçages dans du PBS, les coupes ont été incubées pendant 1 h à TA en présence du complexe avidine-biotine-peroxydase (Kit Vectastain Elite ABC peroxidase standard, VPK-6100, Vector), dilué au 1/1000 dans du PBS. Ce complexe va se fixer aux biotines non-saturées dans le tissu, celles conjuguées au peptide I. Ensuite, les étapes ont été les mêmes que celles précédemment décrites (voir paragraphe VIII.C.2.a des *Matériels et méthodes*).

Pour identifier les cellules marquées par notre peptide biotynilé, nous avons eu recours à de la streptavidine conjuguée à l'Alexa-488, et nous avons réalisé conjointement les détections immunohistochimiques de NeuN, GFAP et CD11b et CD14 comme précédemment décrits (voir paragraphe VIII.C.3 des *Matériels et méthodes*). en utilisant un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-633 (***Tableau MMIII***).

IX. Analyses et traitements des données

IX.A. VARIABLES ANALYSEES

IX.A.1. Analyse de la surface de l'hippocampe sur coupes colorées au crésyl violet

Des images de l'hippocampe dorsal ont été acquises au microscope Diaplan (Leica) couplé à une caméra couleur (modèle DXC-930P, Sony 3CCD) au grossissement X4, qui permettait d'avoir sur l'image, l'hippocampe dorsal dans sa totalité. Pour chaque image, le périmètre de l'hippocampe dorsal a été délimité par l'observateur et la surface mesurée par le logiciel d'analyse d'image Visilog version 6.3 (Noesis).

IX.A.2. Analyse de la quantité des ARNm cibles détectés par RT étalonnée et PCR quantitative

A l'issue de la PCR, le nombre de copies de l'ADNc amplifié est calculé à partir de la valeur du point de sortie (voir paragraphe IV.B.2 des *Matériels et méthodes*).

IX.A.3. Quantification des protéines par ELISA

La gamme étalon fournie avec les trousses de réactifs de chez Biosource (N° catalogue #KRC0011 pour l'IL-1β et KRC0712/KRC0711 pour l'IL-1 Ra) permet de calculer respectivement la concentration d'IL-1β (en pg/mL) et d'IL-1 Ra (en pg/mL). Pour chacun des échantillons, cette concentration est rapportée à la concentration des protéines solubles totales (voir paragraphe VII.C des *Matériels et méthodes*).

IX.A.4. Analyse des coupes traitées en immunohistochimie et révélées à la péroxydase

IX.A.4.a. Mesure de la densité de neurones de la densité de microglie

Des images des régions d'intérêt de l'hippocampe dorsal ont été acquises au microscope Diaplan (Leica) couplé à une caméra couleur (modèle DXC-930P, Sony 3CCD) au grossissement X10. Les zones à analyser ont été délimitées par l'observateur et la surface totale de chacune de ces zones ainsi que la surface de marquage à l'intérieur de chacune de ces zones ont été calculées par le logiciel d'analyse d'image Visilog version 6.3 (Noesis). La valeur de densité obtenue correspondait à la surface de marquage NeuN (pour la densité neuronale) ou CD11b (pour la densité microgliale) rapportée à la surface totale de la zone délimitée. Le choix d'exprimer ces résultats en densité de marquage plutôt qu'en nombre de

cellules marquées résulte de la difficulté de séparer les cellules les unes des autres dans les zones les plus marquées.

IX.A.4.b. Comptage de cellules rondes CD-11b positives

Les coupes sur lesquelles a été détéctée CD-11b ont été placées sous le microscope Diaplan (Leica) couplé à une caméra couleur (modèle DXC-930P, Sony 3CCD) au grossissement X10. Les régions du GD, de la bordure dorsale à la bordure ventrale, et du hile ont été balayées et le nombre de cellules CD-11b positives à la morphologie ronde a été compté.

IX.A.5. Analyse des coupes utilisées pour le double immunomarquage fluorescent

Les coupes doublement marquées ont été observées à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SP2 ; Leica microsystèmes SA). Les fluorochromes couplés aux Ac secondaires présents sur les coupes ont été excités à l'aide d'un laser à l'Argon à une longueur d'onde de 488 nm ou à l'aide d'un laser à l'Hélium-Néon à une longueur d'onde de 633 nm. Le logiciel d'analyse du signal filtre la fluorescence émise par les différents fluorochromes : pour l'Alexa Fluor 488, le logiciel récupère la fluorescence entre 497 et 527 nm (vert) ; pour l'Alexa Fluor 633, le signal est recueilli pour des longueurs d'onde comprises entre 550 et 663 nm (rouge). Une fois le z défini pour chacune des coupes correspondant à l'épaisseur de 1 µm où le marquage est optimal, une image a été capturée pour les deux fluorochromes et pour le DAPI en trois séquences consécutives. Une fois les images acquises, elles ont été superposées à l'aide du logiciel Adobe Photoshop™ version 8. Une co-localisation du marquage correspond à une superposition des marquages vert et rouge visualisée sur l'image par du jaune.

IX.B. EXPRESSION DES RESULTATS

Pour chaque étude, un nombre n de rats a été utilisé dans chacun des groupes expérimentaux. La moyenne des mesures obtenues pour chacun de ces groupes a été calculée, ainsi que l'erreur standard sur la moyenne (SEM). Les résultats sont exprimés pour chaque étude par la moyenne ± SEM des valeurs obtenues.

Lors de la comparaison des variations de quantité des ARNm cibles à la suite du *SE*, les valeurs moyennes acquises pour chaque groupe à chacun des temps étudiés ont été exprimées en pourcentage de la valeur moyenne obtenue chez les témoins ± SEM.

Lors de la comparaison des différentes quantifications réalisées sur les coupes coronales entre les différents groupes de rats, les valeurs moyennes obtenues pour chaque

groupe ont été exprimées en pourcentage de la valeur moyenne obtenue chez les témoins ± SEM.

IX.C. TRAITEMENTS STATISTIQUES DES RESULTATS

La surface de l'hippocampe des différents groupes a été comparée par une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA II) où le facteur 1 était le plan anatomique et le facteur 2 le groupe expérimental.

Pour chaque ARNm cible, la quantité d'ARNm mesurée dans les différents temps de l'épileptogenèse a été comparée par une analyse de variance à un facteur (ANOVA I) et ce, pour chaque structure cérébrale étudiée.

La quantité de protéines (IL-1β ou IL-1 Ra) mesurée dans les différents temps de l'épileptogenèse a été comparée par une ANOVA I.

Les effets anti-inflammatoires sur le taux d'ARNm mesuré au temps 8 h et au temps 4 j de l'épileptogenèse ont été déterminés par une ANOVA II.

La quantité d'ARNm de l'héparanase mesurée aux différents âges a été comparée par une ANOVA Iet ce, pour chaque structure cérébrale étudiée.

Les densités neuronales ou microgliales mesurées aux différents temps de l'épileptogenèse ont été comparées par une ANOVA I et ce, pour chaque région de l'hippocampe étudiée.

Lorsque le test d'égalité des variances était positif et que les résultats de l'ANOVA étaient significatifs, les groupes expérimentaux ont été comparés entre eux par un test *post-hoc* de comparaison multiple Fisher LSD. Nous avons considéré qu'une différence entre deux valeurs était significative lorsque le risque statistique de premier ordre était inférieur ou égal à 5%. Les traitements statistiques des données ont été réalisés à partir du logiciel SigmaStat (SPSS).

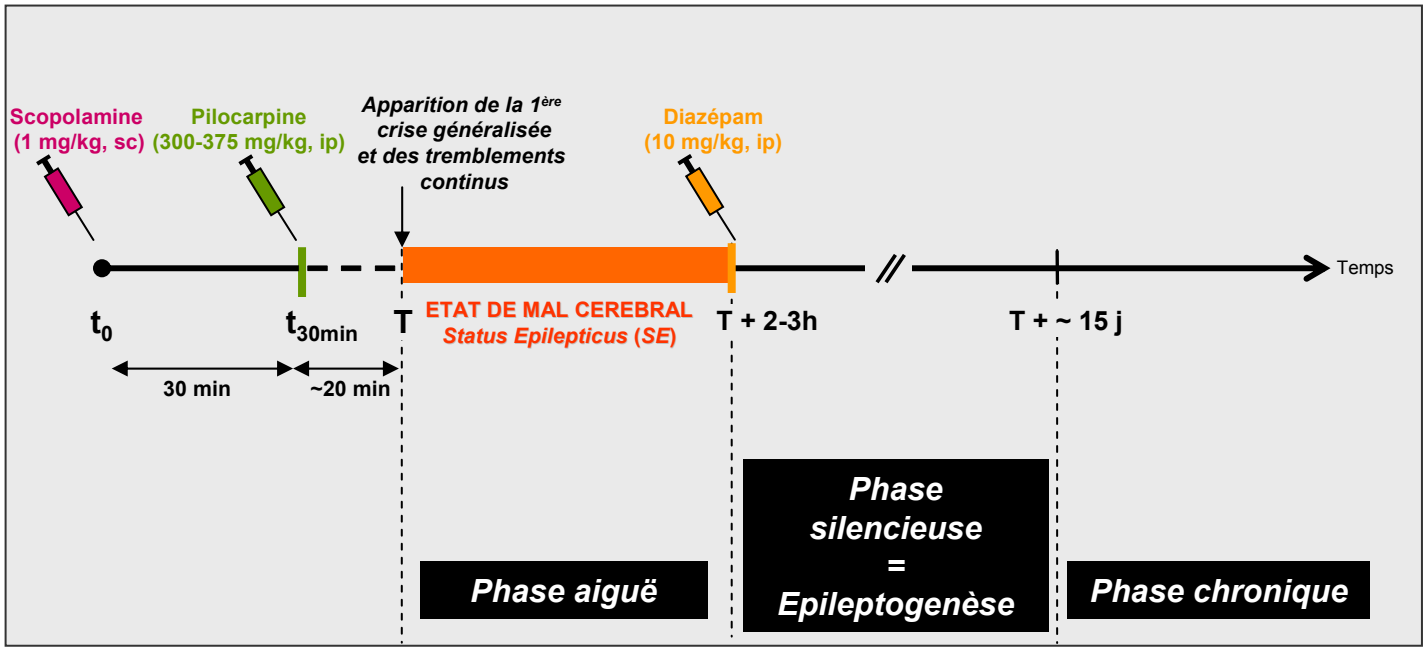


Figure MM1 : Induction du *status epilepticus* par la pilocarpine

Les rats mâles adultes âgés de 7 semaines (jeunes adultes) sont traités le matin (~7h30) au méthyl-nitrate de scopolamine (Sigma) en sous-cutanée (s.c.) à la dose de 1 mg/kg, le temps de traitement à la scopolamine est défini comme étant $\mathbf{t_0}$. Trente minutes après ($\mathbf{t_{30}}$), les rats reçoivent une injection intra-péritonéale (i.p.) de chlorure de pilocarpine (Sigma) à la dose de 300 ou 375 mg/kg. Les rats sont ensuite scrupuleusement observés, avec observation des symptômes caractéristiques des stades comportementaux définis par Racine et leur temps d'apparition; le temps d'apparition de la première crise généralisée de stade 5 suivi d'un *status epilepticus* (*SE*) est défini comme étant **T.** A partir de **T**, les rats sont entrés en état de mal cérébral ou *SE* caractérisé par des tremblements continus au cours desquels se succèdent de nombreuses crises de type tonico-cloniques. Deux ou 3h après **T**, les rats reçoivent une injection i.p. de diazépam (Valium, Roche) à la dose de 10 mg/kg qui marque l'arrêt des tremblements continus et l'arrêt du *SE.* Les rats reçoivent également une injection s.c. de 2 mL de sérum physiologique pour les réhydrater. Le *SE* est parfois appelé la phase aigüe dans le cas de l'induction par la pilocarpine. A partir de la fin du *SE* et pendant une période d'environ 15j, les rats ne vont développer aucune crise de type épileptique. Cette période est appelée la phase silencieuse et correspond à la mise en place de l'épilepsie c'est-à-dire, l'épileptogenèse. A la fin de cette période, qualifiée de phase chronique, les rats vont développer des crises de type épileptique de façon spontanée, et de manière récurrente, caractérisant ainsi la symptomatologie de l'épilepsie partielle du lobe temporal (EPLT).

EXPERIMENTATION N°1

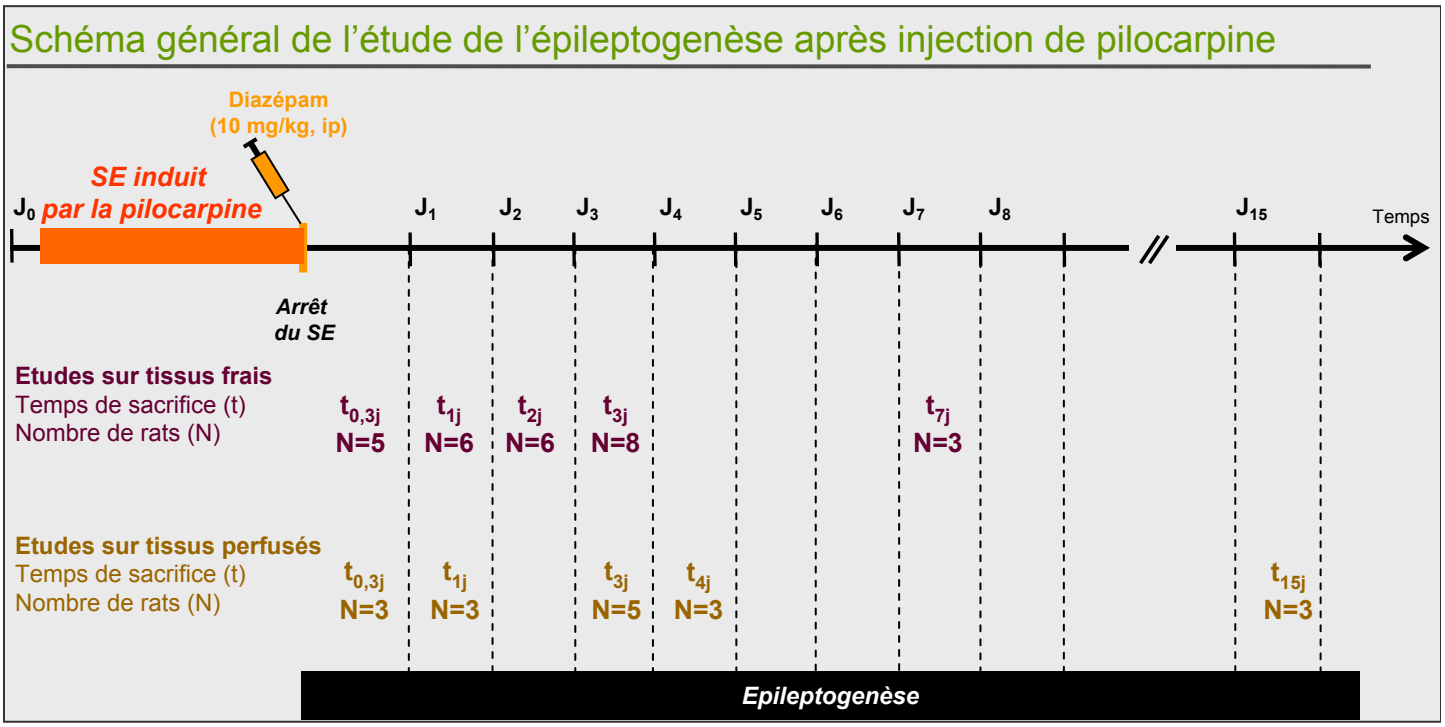


Figure MM4 : Caractérisation de la réponse inflammatoire à la suite du *status epilepticus*

Le *SE* a été induit par la pilocarpine, après traitement par la scopolamine. La durée du *SE* était de 3h et le *SE* a été arrêté par l'administration de diazépam.

Dans la première série d'expérimentations, les rats ont été sacrifiés aux temps indiqués après *SE* par l'injection intra-péritonéale de pentobarbital (CEVA) à la dose de 250 mg/kg, par décapitation à l'aide d'une guillotine. Le temps 0,3j correspond au temps 8h après début du *SE*. Les cerveaux ont rapidement été récupérés et les structures cérébrales d'intérêt ont rapidement été micro-dissequées sur une table refrigérée « *sans ARN* » et placés dans l'azote liquide, avant d'être conservées à -80°C.

Dans la seconde série d'expérimentations, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital (250 mg/kg; CEVA) au temps indiqué après *SE*. Les rats ont ensuite été placés sur une table de dissection et une canule de perfusion a été introduite dans leur ventricule gauche. La circulation périphérique a été clampée et une solution de paraformaldéhyde à 4% a été perfusée au débit de 30 mL/min pendant 10 min après rinçage par un tampon phosphate salin (PBS 0,1M pH=7,4). A la fin de la perfusion, les rats ont été décapités et les cerveaux rapidement extraits, et placés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 2h. Après cryo-protection dans une solution de saccharose à 25%, les cerveaux ont été congelés dans de l'isopentane à -40°C avant d'être conservés à -80°C.

EXPERIMENTATION N°2a

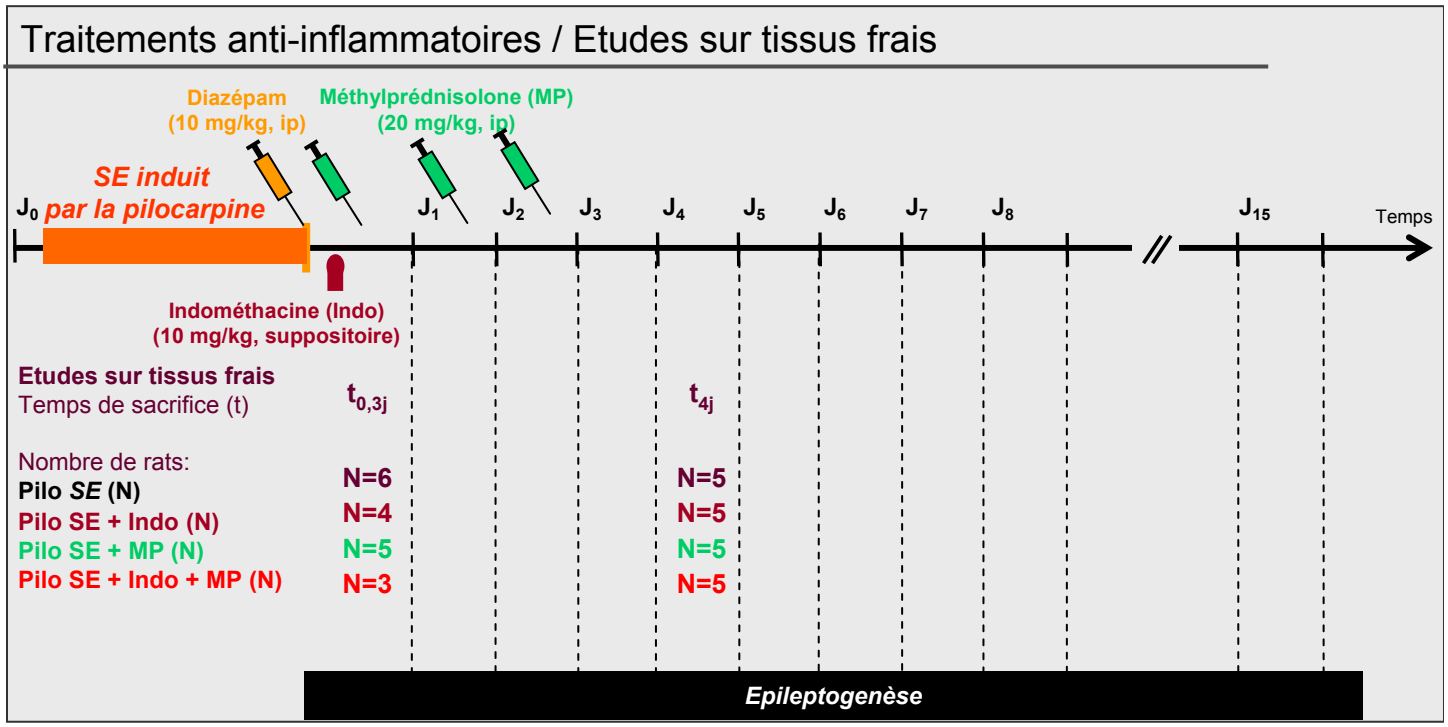


Figure MM5 : Protocole de traitements anti-inflammatoires au cours de l'épileptogenèse après injection de pilocarpine. Procédure expérimentale : prélèvement des tissus frais.

Le *SE* a été induit par la pilocarpine, après traitement par la scopolamine. La durée du *SE* était de 2h et le *SE* a été arrêté par l'administration de diazépam.

L'indométhacine (Indocid, MSD) a été administré à la dose de 10 mg/kg par voie rectale à partir de suppositoire 15 min après l'arrêt du *SE* par le diazépam. Les rats traités à l'indométhacine sacrifiés aux temps 8h (0,3j) et 4j ont reçu une seule administration d'indométhacine.
La solution d'hémisuccinate de méthylprednisolone (SoluMedrol, Pharmacia) a été injectée à la dose de 20 mg/kg aux rats ayant développés un *SE* 15 min, 1j et 2j après arrêt du *SE* par le diazépam. Les rats sacrifiés au temps 8h (0,3j) ont reçu une seule injection de méthylprednisolone alors que les rats sacrifiés au temps 4j ont reçu 3 injections au total de méthylprednisolone.
Les rats Pilo-SE désignent les rats qui ont développé un *SE* après l'injection de pilocarpine, mais qui n'ont reçu aucun traitement anti-inflammatoire après l'arrêt du *SE* par le diazépam.

Aux temps 8h (0,3j) et 4j de l'épileptogenèse, les rats ont été sacrifiés par l'injection intra-péritonéale de pentobarbital (CEVA) à la dose de 250 mg/kg par décapitation. Les cerveaux ont rapidement été récupérés et les structures cérébrales d'intérêt ont rapidement été micro-dissequées sur une table refrigérée « *sans ARN* » et congelées dans l'azote liquide, avant d'être conservées à -80°C.

EXPERIMENTATION N°2b

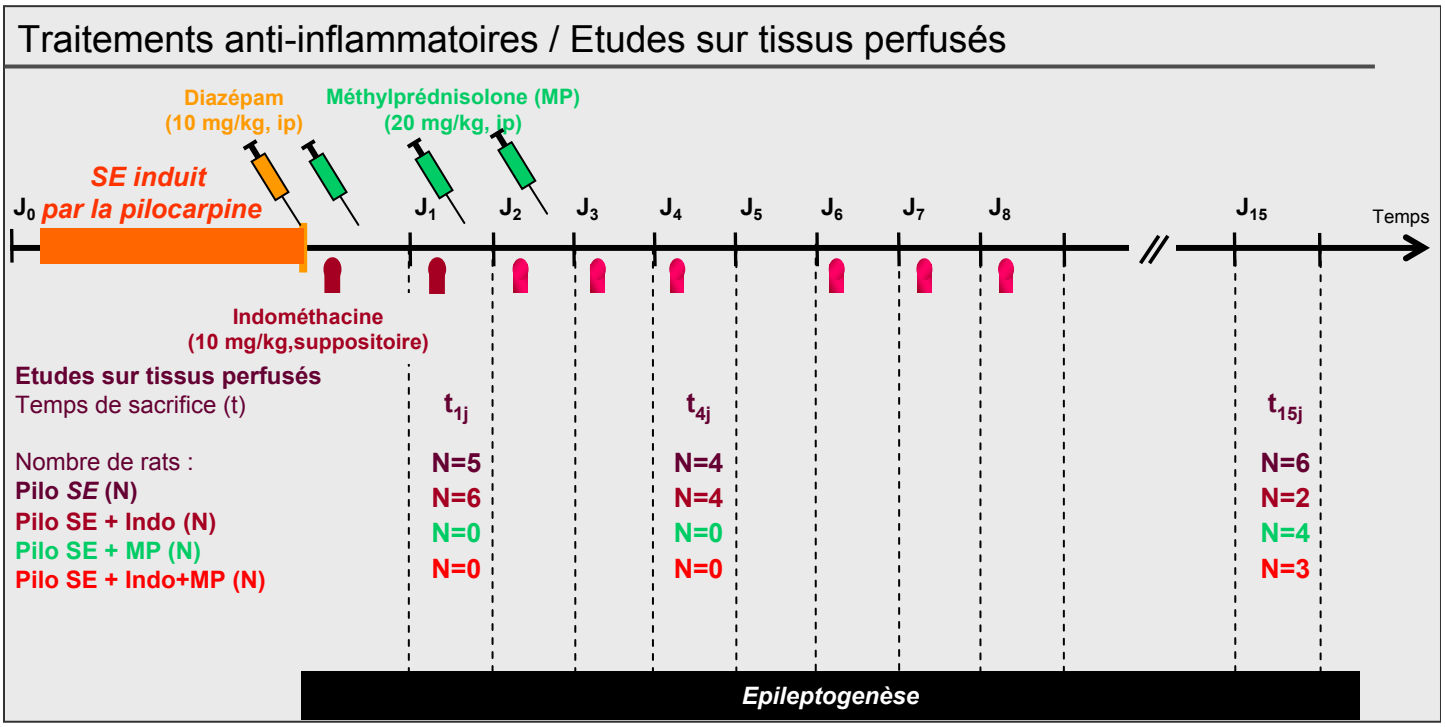


Figure MM6 : Protocole de traitement par les anti-inflammatoires au cours de l'épileptogenèse après induction du *SE* par la pilocarpine. Procédure expérimentale : perfusion des tissus.

Le *SE* a été induit par la pilocarpine, après traitement par la scopolamine. La durée du *SE* était de 2h et le *SE* a été arrêté par l'administration de diazépam.

L'indométhacine a été administrée à la dose de 10 mg/kg (*en violet sur le schéma*) par voie rectale à partir de suppositoire (Indocid, MSD), 15 min et 1j après l'injection de diazépam. A partir du 2ième jour de traitement à l'indométhacine, la dose administrée est de 5 mg/kg (*en violet et rouge sur le schéma*). Les rats traités à l'indométhacine sacrifiés au temps 1j ont reçu deux administrations d'indométhacine à la dose de 10 mg/kg. Les rats sacrifiés au temps 4j ont reçu deux administrations d'indométhacine à la dose de 10 mg/kg et trois administrations d'indométhacine à la dose de 5 mg/kg, et enfin les rats sacrifiés au temps 15j ont reçu deux administrations d'indométhacine à la dose de 10 mg/kg et six administrations à la dose de 5 mg/kg.
La solution d'hémisuccinate de méthylprednisolone (SoluMedrol, Pharmacia) a été injectée à la dose de 20 mg/kg aux rats ayant développé un *SE* 15 min, 1j et 2j après arrêt du *SE* par le diazépam. Les rats sacrifiés au temps 1j ont reçu une seule injection de méthylprednisolone alors que les rats sacrifiés au temps 4j et 15j ont reçu 3 injections au total de méthylprednisolone.
Les rats Pilo-SE désignent les rats qui ont développé un *SE* après l'injection de pilocarpine, mais qui n'ont reçu aucun traitement anti-inflammatoire après l'arrêt du *SE* par le diazépam.

Pour chaque temps indiqué, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital (250 mg/kg; CEVA) puis placés sur une table de dissection. Une canule de perfusion a été introduite dans leur ventricule gauche. La circulation périphérique a été clampée et une solution de paraformaldéhyde à 4% a été perfusée au débit de 30 mL/min pendant 10 min après rinçage par un tampon phosphate salin (PBS 0,1M ph=7,4). A la fin de la perfusion, les rats ont été décapités et les cerveaux rapidement extraits, et placés dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 2h. Après cryo-protection dans une solution de saccharose à 25%, les cerveaux ont été congelés dans de l'isopentane à -40°C avant d'être conservés à -80°C.

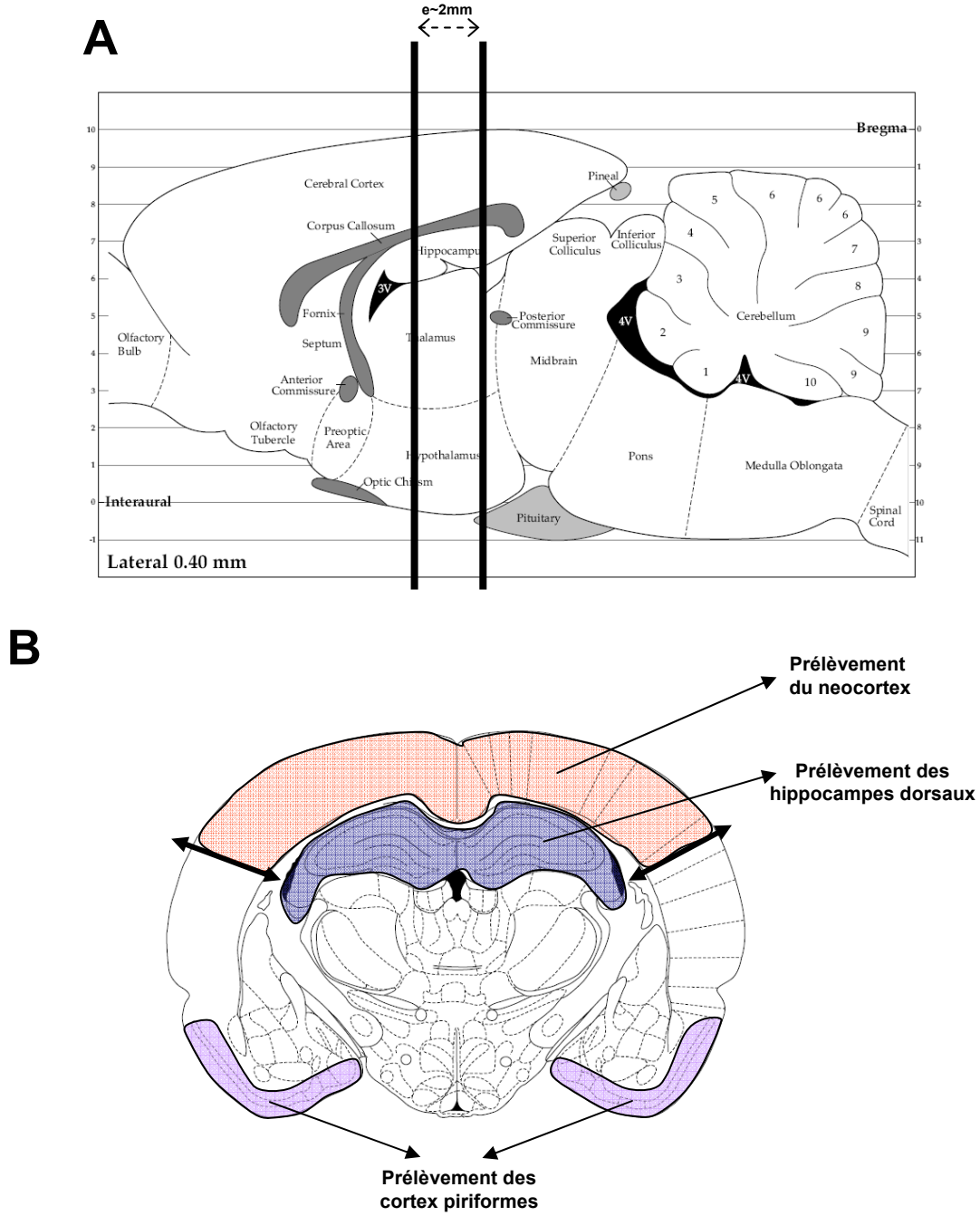


Figure MM7 : Procédure expérimentale de micro-dissection des structures cérébrales d'intérêt

Après décapitation, la tête des rats a été immédiatement placée à 4°C dans de la glace et les cerveaux ont été rapidement extraits de la boîte crânienne et placés sur un plan de travail réfrigéré dans un environnement « sans ARN ». Les bulbes olfactifs ont également été prélevés. Les structures cérébrales d'intérêt ont alors été micro-disséquées. (**A**) Les hippocampes et les cortex ont été prélevés à partir d'une coupe coronale d'environ 2mm d'épaisseur réalisée au niveau des hémisphères cérébraux. (**B**) Les repères anatomiques qui permettent la localisation des différentes structures sur les coupes coronales ont été les mêmes pour chaque cerveau et pour chaque âge. Les tissus collectés ont été congelés immédiatement dans de l'azote liquide. Toutes ces procédures ont été réalisées rapidement pour éviter d'une part les modifications tissulaires post-mortem et d'autre part la dégradation des ARN présents dans les échantillons de tissus. Les échantillons ont été par la suite conservés dans un congélateur à -80°C jusqu'à utilisation.

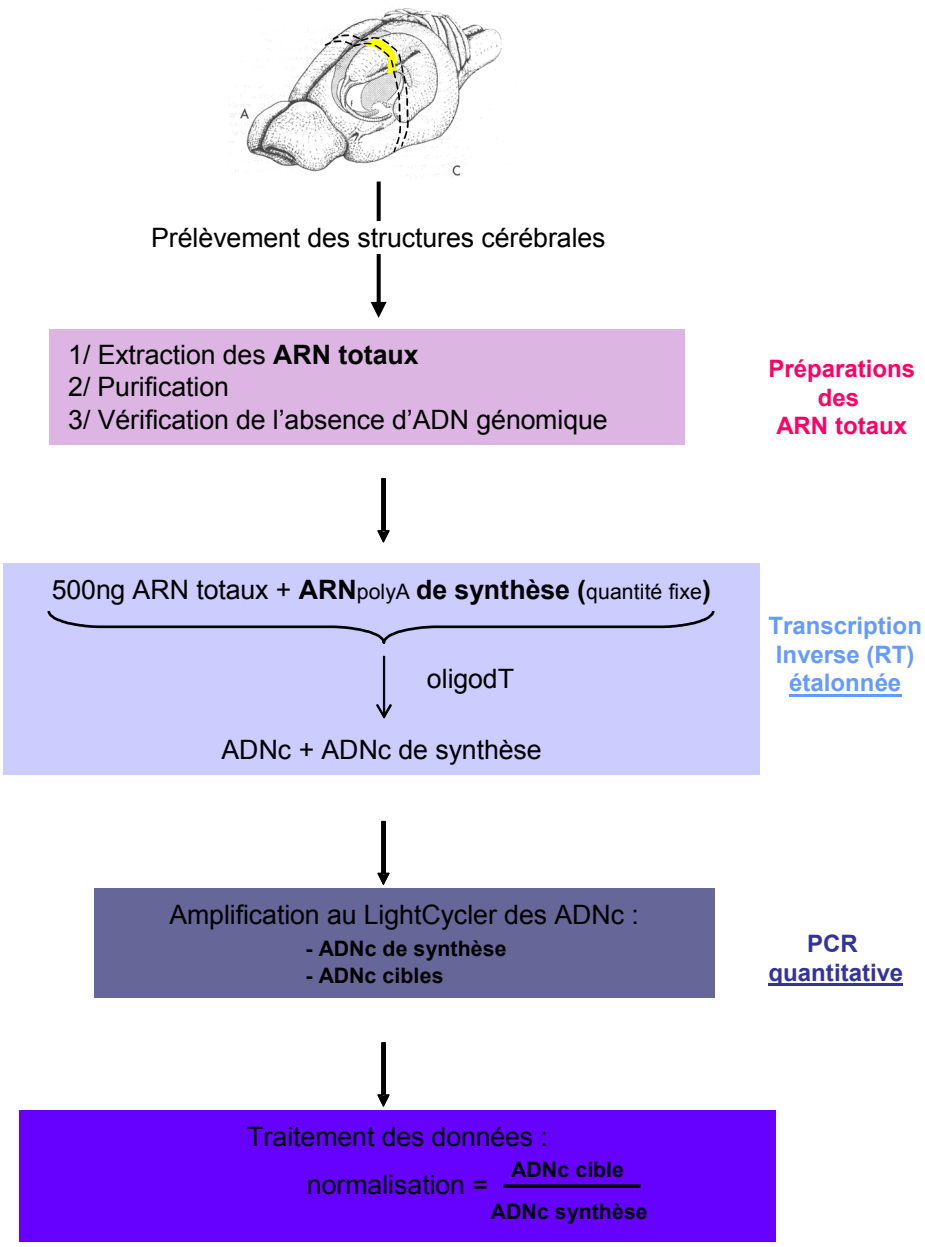


Figure MM8 : Détection des ARN messagers tissulaires à partir de la RT étalonnée suivie d'une PCR en temps réel

Ce schéma récapitule la procédure expérimentale utilisée pour doser les ARNm d'intérêt à partir d'homogénats tissulaires. Les ARN totaux sont d'abord extraits et plusieurs témoins sont réalisés pour vérifier leur qualité et leur non-contamination par de l'ADN génomique. Puis, la réaction de transcription inverse (reverse transcription RT) est réalisée en utilisant une amorce oligodT : les ARNm qui possèdent tous une queue polyA sont retro-transcrits en ADNc. Un ARN étalon (SmRNA) est introduit dans les échantillons à une quantité connue, lui-même rétr-transcrit en ADNc (ScDNA). Les ADNc cibles et le ScDNA sont alors amplifiés par PCR en utilisant un couple d'amorce sens et anti-sens spécifiques de leurs séquences respectives et la Taq polymérase (Hot Start Taq). Le logiciel associé au Light Cycler fournit pour chaque échantillon et chaque ADNc cible le point de sortie « PS » ou « Crossing Threshold (CT) » qui correspond au premier cycle d'amplification linéaire. Une gamme étalon préalablement établi pour chaque ADNc cible nous permet de calculer la quantité d'ADNc initiale dans le milieu réactionnel avant PCR, c'est-à-dire à l'issue de la RT. La quantité calculée de ScDNA initiale et celle de SmRNA introduit avant RT nous permet de calculer le rendement de la RT, qui sera utilisé pour la normalisation de nos données.

ADNc amplifié	Amorces	Taille de l'amplicon (paires de bases)	Référence GenBank
BDNF exon V	Sens : 5' AAA TTA CCT GGA TGC CGC AA -3' Anti-sens: 5' CGC CAG CCA ATT CTC TTT TT -3'	**345**	**X67108.1**
IL-1β	Sens : 5' GCA CCT TCT TTT CCT TCA TCT-3' Anti-sens: 5' CCG CTT TTC CAT CTT CTT CTT-3'	**374**	**M98820.1**
IL-1 Ra	Sens : 5' TCT GGA GAT GAC ACC AAG CTC-3' Anti-sens: 5' GCC TCT AGT GTT GTG CAG AGG-3'	**167**	**NM_022194.1**
IL-1 R	Sens : 5' CAC GGA ATG AGA CGA TGG AAG-3' Anti-sens: 5' ACG AAG CAG ATG AAC GGA TAG-3'	**250**	**M95578.1**
TNF-α	Sens : 5' CAA ACC ACC AAG CAG AGG AG -3' Anti-sens: 5' GTG AGG AGC ACA TAG TCG GG-3'	**175**	**X66539.1**
IL-6	Sens : 5' TAC CAC CCA CAA CAG ACC A -3' Anti-sens: 5' TCC AGA AGA CCA GAG CAG A -3'	**243**	**NM_012589.1**
MCP-1	Sens : 5' CGG CTG GAG AAC TAC AAG AGA -3' Anti-sens: 5' TCT CTT GAG CTT GGT GAC AAA TA -3'	**78**	**M57441.1**
MIP-1α	Sens : 5' TCC ACG AAA ATT CAT TGC TG -3' Anti-sens: 5' AGA TCT GCC GGT TTC TCT TG-3'	**92**	**U06435.1**
MIP-1β	Sens : 5' CTC TGC GTG TCT GCC TTC T-3' Anti-sens: 5' GTG GGA GGG TCA GAG CCT AT -3'	**89**	**U06434.1**
héparanase	Sens : 5' CAA TGA TAT TTG CGG GTC TG -3' Anti-sens: 5' TGC GTT TTG GAA AGC TGA CT -3'	**415**	**NM_022605**

Tableau MMI : Séquences des couples d'amorces nucléotidiques sens et anti-sens utilisés pour l'amplification des ADNc cibles par PCR en temps réel

Les séquences des différents couples d'amorces sens et anti-sens ont été sélectionnées à l'aide du logiciel en ligne « *primer 3* » (NIH http://www.basic.nwe.edu) en prenant en compte les critères de sélections suivants:

- minimiser au maximum les complémentarités internes des séquences pour limiter la formation de structure en épingle à cheveux
- minimiser la complémentarité intrinsèque à l'extrémité 3'OH des amorces pour éviter une « auto-dimérisation »
- minimiser au maximum la complémentarité entre les amorces pour éviter la formation de dimères d'amorces

Abréviations: BDNF, brain derived neurotrophic factor; IL-1β, interleukin-1 beta; IL-1 Ra, interleuki-1 receptor antagonist; IL-1R, interleukin-1 receptor; IL-6, interleukin-6; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha; MIP-1α, macrophage inflammatory protein 1 alpha; MIP-1β, macrophage inflammatory protein 1 beta; MCP-1 monocyte chemoattractant protein-1

ADNc	Dénaturation initiale	Amplification			Fusion			Coefficient directeur de la droite étalon	Efficacité de PCR
		Dénaturation	*Hybridation*	*Elongation*	*Dénaturation*	*Hybridation*	*Fusion*		
BDNF EV	95°C	95 °C	60 °C	72 °C	95° C	70 °C	98 °C	- 3,939	1,749
	10min	15 sec	7 sec	14 sec	0 sec	20 sec	0 sec		
	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec		
IL-1β	95°C	95 °C	60 °C	72 °C	95° C	70 °C	98 °C	- 3,6875	1,87
	10min	15 sec	7 sec	14 sec	0 sec	20 sec	0 sec		
	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec		
Il-1 Ra	95°C	95 °C	60 °C	72 °C	95° C	70 °C	98 °C	- 4,4571	1,6763
	10min	15 sec	4 sec	7 sec	0 sec	20 sec	0 sec		
	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec		
IL-1 R	95°C	95 °C	58 °C	72 °C	95° C	68 °C	98 °C	- 3,696	1,865
	15min	15 sec	30 sec	13 sec	0 sec	20 sec	0 sec		
	20 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec		
TNF-α	95°C	95 °C	58 °C	72 °C	95° C	68 °C	98 °C	- 3,4633	1,944
	15min	15 sec	30 sec	9 sec	0 sec	20 sec	0 sec		
	20 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec		
IL-6	95°C	95 °C	58 °C	72 °C	95° C	68 °C	98 °C	- 3,573	1,905
	15min	15 sec	30 sec	13 sec	0 sec	20 sec	0 sec		
	20 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec		
MCP-1	95°C	95 °C	58 °C	72 °C	95° C	68 °C	98 °C	- 4,5154	1,665
	15min	15 sec	30 sec	6 sec	0 sec	20 sec	0 sec		
	20 °C/sec	15 °C/sec	15 °C/sec	15 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec		
MIP-1α	95°C	95 °C	58 °C	72 °C	95° C	68 °C	98 °C	- 3,6789	1,87
	15min	15 sec	30 sec	6 sec	0 sec	20 sec	0 sec		
	20 °C/sec	15 °C/sec	15 °C/sec	15 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec		
MIP-1β	95°C	95 °C	58 °C	72 °C	95° C	68 °C	98 °C	- 3,5077	1,93
	15min	15 sec	30 sec	6 sec	0 sec	20 sec	0 sec		
	20 °C/sec	15 °C/sec	15 °C/sec	15 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec		
Héparanase	95°C	95 °C	60 °C	72 °C	95° C	70 °C	98 °C	- 3,7353	1,85
	10min	15 sec	9 sec	17 sec	0 sec	20 sec	0 sec		
	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec		

Tableau MMII : Conditions d'amplification des gènes d'intérêt par PCR en « temps réel » sur Light Cycler ™ (Roche®) :

L'amplification est réalisée en moyenne sur 45 cycles. A la fin de chaque cycle d'amplification, une lecture de fluorescence est réalisée à la longueur d'onde d'émission du SYBR Green I, qui ne fluoresce qu'une fois incorporé dans l'ADN double brin. L'étape de fusion permet de calculer la température de fusion spécifique (T_m) de chaque ADNc et permet l'identification des produits amplifiés. L'efficacité de la PCR calculée à partir de la gamme étalon doit être comprise entre 1,6 et 2.

Antigène	Source animale de l'anticorps	Type	Dilution	Procédure de détection	Milieu d'incubation	Fournisseur et référence
			Anticorps primaires			
NeuN	**Souris**	**monoclonal**	**1/2000**	**Flottantes sans DAKO**	**PBS-T-SNA2%**	**Chemicon; MAB-377**
GFAP	**Souris**	**monoclonal**	**1/2500**	**Flottantes sans DAKO**	**PBS-T-SNA2%**	**Sigma; G-3893**
GFAP	**Lapin**	**polyclonal**	**1/3000**	**Flottantes sans DAKO**	**PBS-T-SNA2%**	**Chemicon; AB-5804**
CD-11b	**Souris**	**monoclonal**	**1/2000**	**Flottantes sans DAKO**	**PBS-T-SNA2%**	**Chemicon; CBL-1512Z**
CD-14	**Chèvre**	**polyclonal**	**1/1000**	**Flottantes sans DAKO**	**PBS-T-SNA1%**	**Santa Cruz; sc-5749**
IL-1β	**Chèvre**	**polyclonal**	**1/500**	**Lames avec DAKO**	**PBS-T-SNA2%**	**Santa Cruz; sc-1252**
TNF-α	**Chèvre**	**polyclonal**	**1/100**	**Flottantes sans DAKO**	**PBS-T-SNA2%**	**Santa Cruz; sc-1351**
IL-6	**Chèvre**	**polyclonal**	**1/500**	**Flottantes sans DAKO**	**PBS-T-SNA2%**	**Santa Cruz; sc-1266**
héparanase	**Lapin**	**polyclonal**	**1/350**	**Flottantes sans DAKO**	**PBS-T-SNA2%**	**Covalab**
			Anticorps secondaires conjugués à la biotine			
Anti-IgG de souris	**Âne**	**polyclonal**	**1/1000**		**PBS-T-SNA2%**	**JIR; 715.065.151**
Anti-IgG de lapin	**Âne**	**polyclonal**	**1/1000**		**PBS-T-SNA2%**	**JIR; 711.066.152**
Anti-IgG de chèvre	**Âne**	**polyclonal**	**1/10 000**		**PBS-T-SNA2%**	**JIR; 705.066.147**
Anti-IgG de lapin	**Chèvre**	**polyclonal**	**1/2 000**		**PBS-T-SNC2%**	**Chemicon; AP-187B**
			Anticorps secondaires couplés à l'Alexa-488			
Anti-IgG de souris	**Âne**	**polyclonal**	**1/1000**		**PBS-T-SNA2%**	**Molecular Probes; A21202**
Anti-IgG de lapin	**Âne**	**polyclonal**	**1/1500**		**PBS-T-SNA2%**	**Molecular Probes; A21206**
Anti-IgG de chèvre	**Âne**	**polyclonal**	**1/1500**		**PBS-T-SNA2%**	**Molecular Probes; A11055**
			Anticorps secondaires couplés à l'Alexa-633			
Anti-IgG de souris	**Chèvre**	**polyclonal**	**1/1000**		**PBS-T-SNA2%**	**Molecular Probes; A21052**
Anti-IgG de chèvre	**Âne**	**polyclonal**	**1/1000**		**PBS-T-SNA2%**	**Molecular Probes; A21082**

Tableau MMIII : Liste des anticorps utilisés pour les détections immunohistochimiques

Ce tableau récapitule les anticorps utilisés pour les détections immunohistochimiques des antigènes d'intérêt. Les anticorps secondaires conjugués à la biotine ont été utilisés pour le marquage colorimétrique par la révélation à la peroxydase. Les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome (Alexa-488 ou Alexa-633) ont été utilisés pour le marquage fluorescent révélé par exposition à la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome choisi.

Abréviations: NeuN, neuronal nuclear protein ; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; IL-1β, interleukine-1 béta; IL-6, interleukine-6; TNF−α, tumor necrosis factor-alpha; IgG, Immunoglobulin G; PBS, tampon phosphate salin; SNA, sérum normal d'âne; SNC, sérum normal de chèvre.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Caractérisation de la ré-organisation cellulaire associée à la mort des neurones après *status epilepticus* induit par la pilocarpine.

Nos observations ont confirmé que tous les rats avaient développé des crises spontanées et récurrentes 14 jours après *SE*. Nous avons cherché à savoir si l'hippocampe de rat présentait 15 jours après *SE* induit par la pilocarpine, les mêmes modifications que celles observées dans de l'hippocampe de patients atteints d'EPLT. La principale modification morphologique détectée par imagerie médicale chez les patients atteints d'EPLT est la sclérose de l'hippocampe [68]. Brièvement, cette sclérose de l'hippocampe est caractérisée par une perte sélective des neurones associée à une ré-organisation structurale [68,227] (voir paragraphe I.A.2.c. de l'historique scientifique). L'accumulation d'astrocytes réactifs dans les zones lésées est également caractéristique de l'hippocampe sclérosé des patients épileptiques [48]. Nous avons donc recherché sur les rats soumis à une épileptogenèse expérimentale si cette région du cerveau présentait non seulement une atrophie, une perte sélective de neurones et une accumulation d'astrocytes réactifs, mais aussi une activation de la microglie.

I.A. LA SCLEROSE DE L'HIPPOCAMPE APRES INDUCTION DU STATUS EPILEPTICUS PAR LA PILOCARPINE.

I.A.1. Atrophie de l'hippocampe de rats à la fin de l'épileptogenèse

L'hippocampe des rats ayant développé un *SE* 15 jours auparavant (15 j/ PiloSE) présente, pour chaque plan anatomique sélectionné (Atlas Paxinos et Watson, édition de 1998), une surface réduite par rapport à celle mesurée chez les rats témoins naïfs (TN) (***Figures R1A, R1B, R1C, R1D***). L'atrophie de l'hippocampe chez les rats15 j/ PiloSE correspond alors à une réduction d'environ 25% de la surface totale de l'hippocampe (qui correspond à la somme des surfaces mesurées dans les 8 plans anatomiques sélectionnés) (***Figure R1E***).

I.A.2. Estimation de la perte des neurones

L'hippocampe de rat rendu épileptique est atrophié. Cette réorganisation structurale est-elle associée à une perte sélective des neurones de l'hippocampe ?

La perte des neurones a été évaluée dans les régions CA1, CA2, CA3, dans le hile et dans le *SLMo* de l'hippocampe (IA : +5,70 selon l'atlas de Paxinos et Watson, édition 1998). Cette évaluation est fondée sur la densité de marquage immunohistochimique de NeuN (marqueur spécifique des neurones) dans les régions CA1 (***Figures R2A, R2B***), CA2 et CA3 et sur la densité de cellules NeuN-positives dans le hile (***Figures R2C, R2D***) et la *SLMo*. Nous avons choisi d'estimer la perte des neurones par la mesure de la densité plutôt que par la mesure du nombre de cellules marquées, compte tenu des modifications structurales qui affectent l'hippocampe (voir paragraphe I.A.1. des résultats). La perte des neurones est plus accentuée dans certaines zones de l'hippocampe que dans d'autres zones chez les rats 15 j/ PiloSE (***Figure R2E***) : les zones les plus vulnérables étant le hile (~ -45%) et la région CA3 (~ -36%) et les zones les plus résistantes étant la couche granulaire du GD (*donnée non illustrée*) et CA2 (~ -20%). La région CA1 des rats 15 j/ PiloSE présente une perte neuronale intermédiaire, mais significative, estimée à ~-21,5% (***Figure R2E***). La perte des neurones du *SLMo* est plus hétérogène chez les rats 15 j/ PiloSE, ce qui rend la diminution moyenne non significative (~ -28%) (***Figure R2E***).

I.A.3. Appréciation de la cicatrice gliale

Quinze jours après l'induction expérimentale du *SE*, les cerveaux de rats présentent une atrophie de l'hippocampe associée à une perte sélective des neurones de cette structure. Nous avons cherché à savoir si cette perte des neurones était associée à une réactivité des cellules gliales du voisinage (astrocytes et microglie).

Les astrocytes, détectés grâce au marquage immunohistochimique de la GFAP, sont plus nombreux et ils présentent un corps cellulaire hypertrophié dans l'hippocampe de rats 15 j/ PiloSE (***Figures R2G, R2I***) par rapport à ceux de l'hippocampe de rats TN (***Figures R2F, R2H***). Une cicatrice gliale (abondance d'astrocytes réactifs) est donc observée dans les zones de lésion de l'hippocampe de rats 15 j/ PiloSE.

Il apparaît de plus en plus clair que la cicatrice gliale est également composée de cellules microgliales activées. En effet, les cellules microgliales activées, détectées grâce au marquage immunohistochimique de CD11b (récepteur de la molécule du complément C3b), sont très abondantes dans les zones de lésion du cerveau chez les rats 15 j/ PiloSE. Les zones de lésion sont caractérisées par la disparition du marquage de NeuN chez les rats 15j/ PiloSE par rapport aux rats TN (***Figures R3A, R3C***) et l'accumulation de cellules microgliales activées est visualisée par un intense marquage de CD11b chez les rats 15j/ PiloSE (***Figures R3B, R3D***). Ceci indique que l'intensité de la réactivité microgliale dans une région du cerveau dépend de l'ampleur de la perte des neurones qui affecte cette région. Dans le hile, la

densité de marquage CD11b est corrélée avec celle de NeuN (définie par un coefficient de détermination de 0,841) : plus la densité de marquage de CD11b est forte, plus la densité de marquage de NeuN est faible (***Figure R3E***).

En conclusion, nous avons mis en évidence une sclérose de l'hippocampe chez le rat dès 15 jours après une induction expérimentale du *SE* par la pilocarpine. Cette sclérose de l'hippocampe est caractérisée par une perte de neurones et par la présence d'une cicatrice gliale, ce qui modèlise bien les lésions histo-pathologiques observées sur les pièces réséquées de patients atteints d'EPLT. En particulier, nous avons montré que les neurones du hile étaient vulnérables et que l'ampleur des dommages dans cette région était corrélée à une forte présence de cellules microgliales activées.

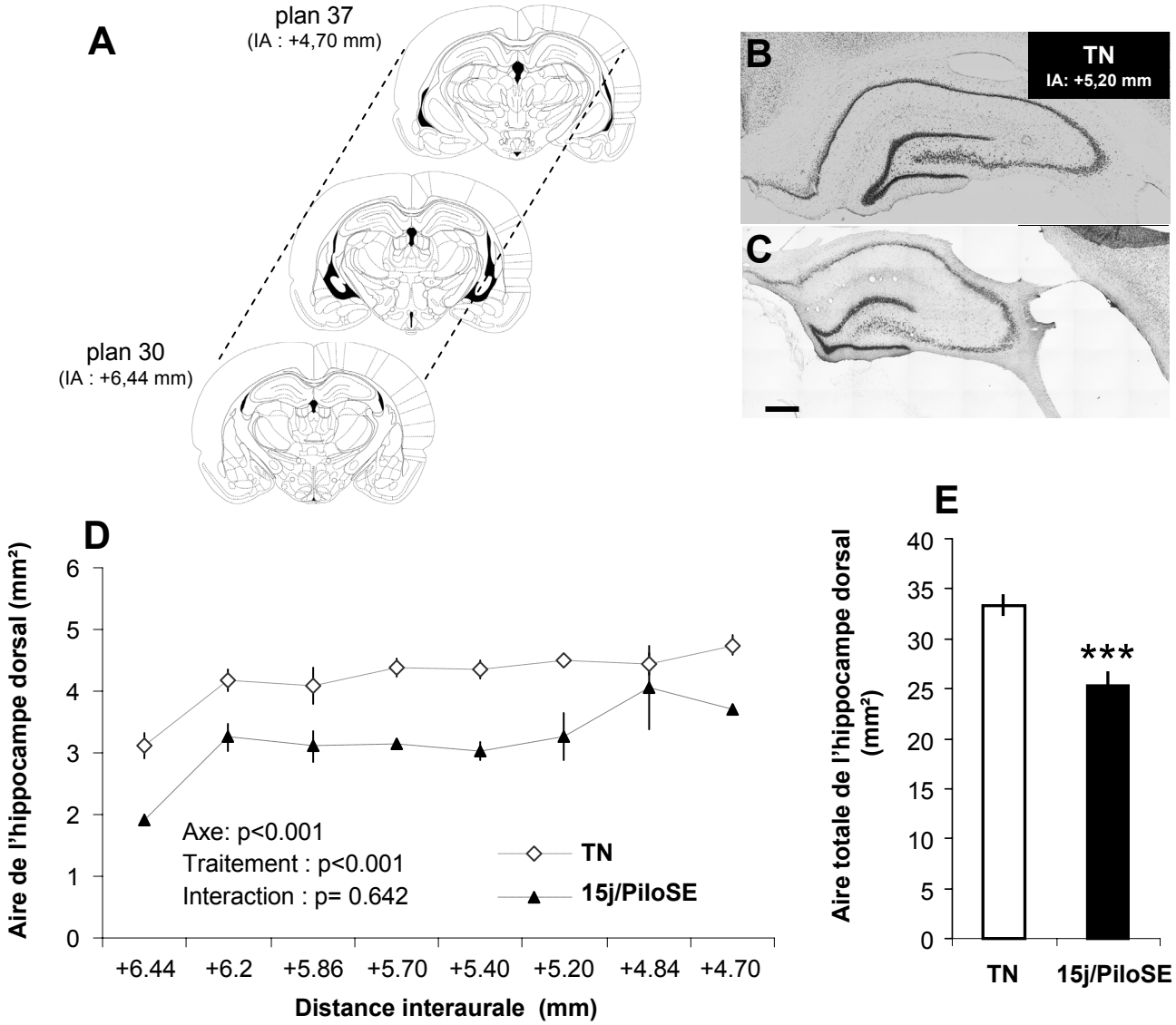


Figure R1 : Mesure de l'atrophie de l'hippocampe dorsal après induction du *SE* par la pilocarpine

Des coupes coronales de 30 µm d'épaisseur de cerveaux perfusés de rats témoins naïfs (TN) et de rats ayant développé 15 jours auparavant un *SE* induit par la pilocarpine (phase chronique, noté 15j/PiloSE) sont récoltées le long de l'axe rostro-caudal (**A**). Tous les intervalles de 180 µm, les coupes sont colorées au crésyl violet afin de recaler anatomiquement tous les cerveaux selon l'atlas de Paxinos et Watson (4ième édition, Academic Press 1998). La surface de l'hippocampe est mesurée en utilisant le logiciel d'analyse d'image visolog version 6.3 sur les coupes colorées au crésyl violet de cerveaux de rats TN (n=3) (**B**) et de rats du groupe 15j/PiloSE (n=3) (**C**). La surface de l'hippocampe dorsal est représentée le long de l'axe rostro-caudal pour chacun des deux groupes (rectangle blanc, le groupe des rats TN; triangle noir, le groupe de 15j PiloSE)(**D**). La surface totale (somme des surfaces de chacun des 8 plans) est également représentée (**E**). Test statistique ANOVA II et test t: ***, p<0,001 en comparaison des rats témoins naïfs. Barre de mesure : C, 500 µm.

<u>*Abréviations*</u> : TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; IA, Interaurale.

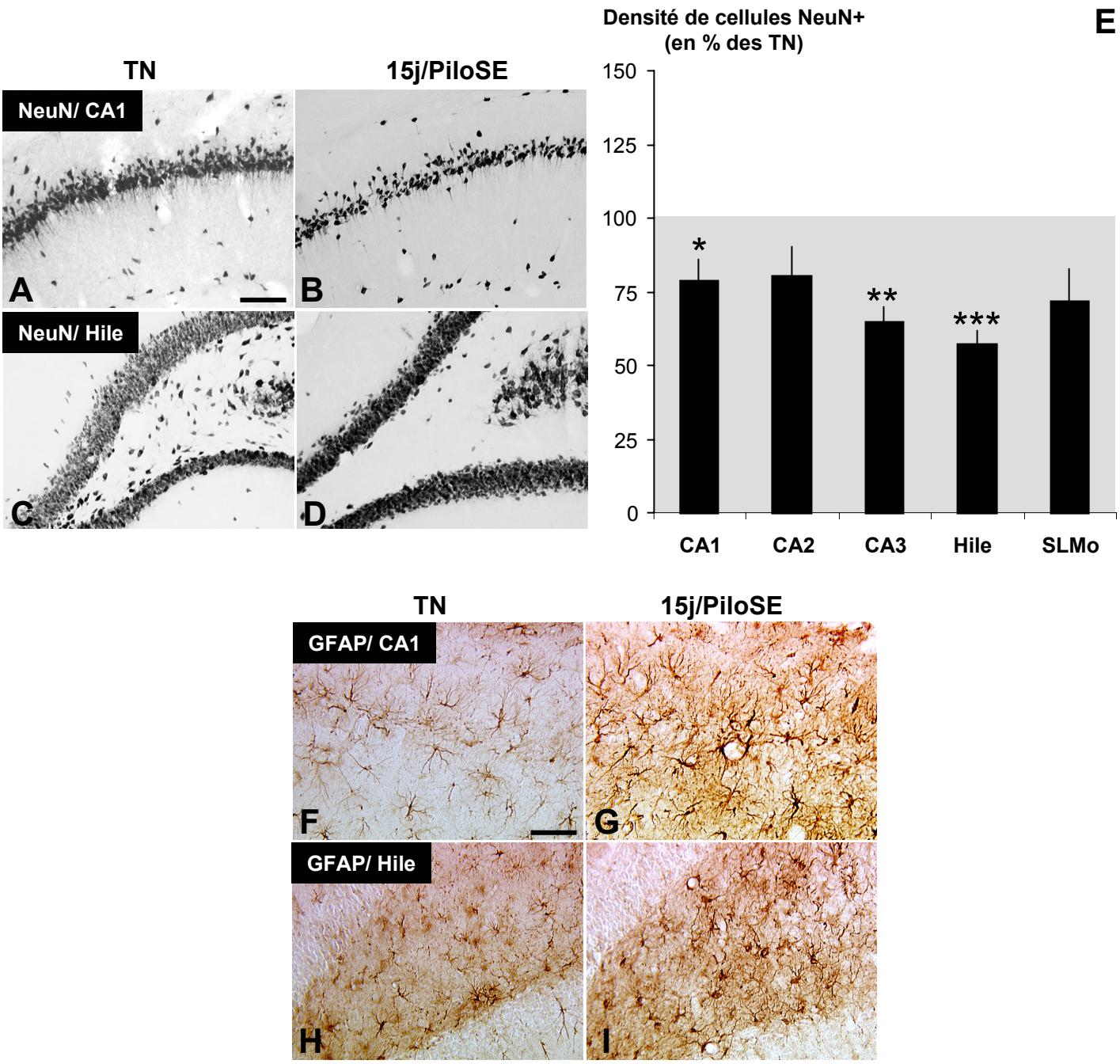
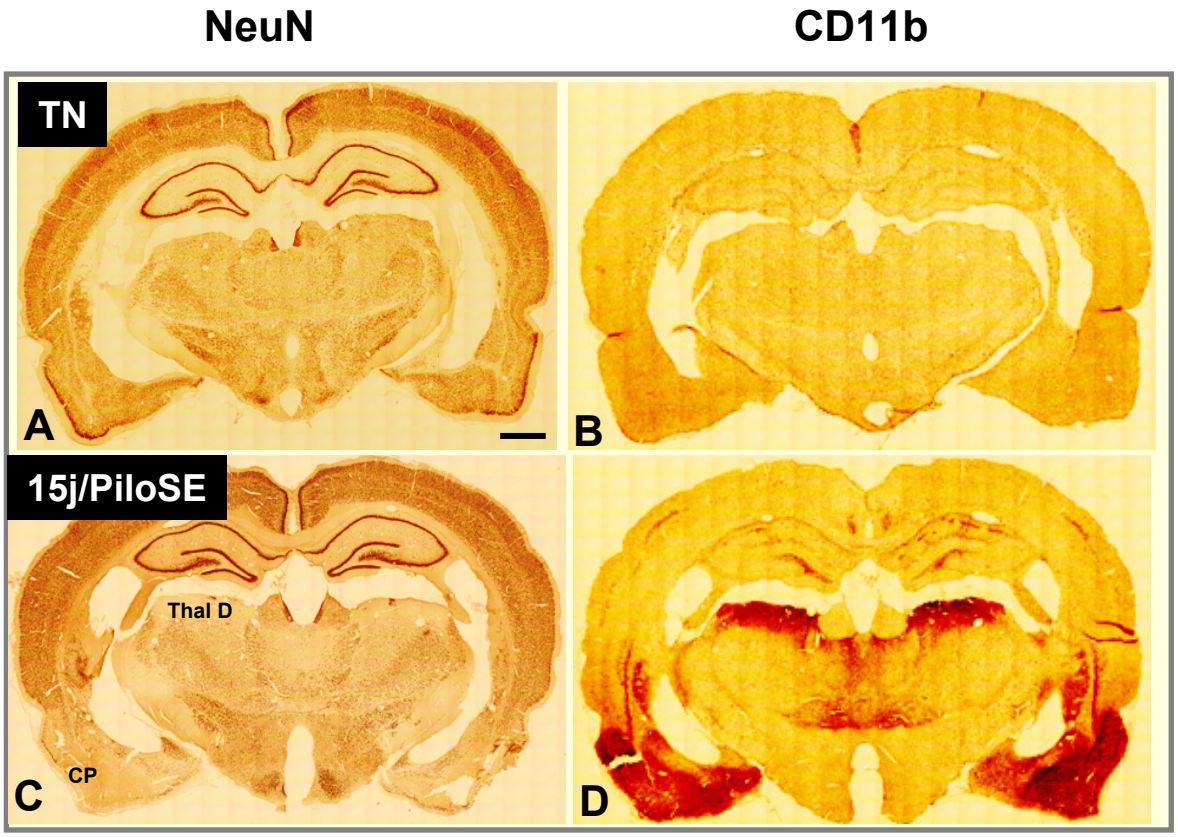


Figure R2 : Estimation de la perte de neurones et appréciation de la réactivité des astrocytes dans l'hippocampe dorsal après induction du *SE* par injection de pilocarpine

Cellules NeuN-positives (NeuN, marqueur de neurones) de CA1 (**A** et **B**) et hile (**C** et **D**) de l'hippocampe de rats TN (**A** et **C**) et de rats 15j/PiloSE (**B** et **D**). La densité des cellules NeuN-positives est représentée en fonction des deux groupes (TN, n=3; 15j/PiloSE n=3) selon les régions de l'hippocampe (**E**). Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: *, $p<0,05$; **, $p<0,01$, ***, $p<0,001$ en comparaison des rats TN. Cellules GFAP-positives (GFAP, marqueur d'astrocytes) dans CA1 (**F** et **G**) et dans le hile (**H** et **I**) de l'hippocampe de rats TN (**F** et **H**) et de rats 15j/PiloSE (**G** et **I**). Barres de mesure : A, 100 µm; F, 50 µm.

Abréviations : TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; SLMo, *stratum lacunosum Moleculare;* GFAP, Protéine acide fibrillaire gliale.



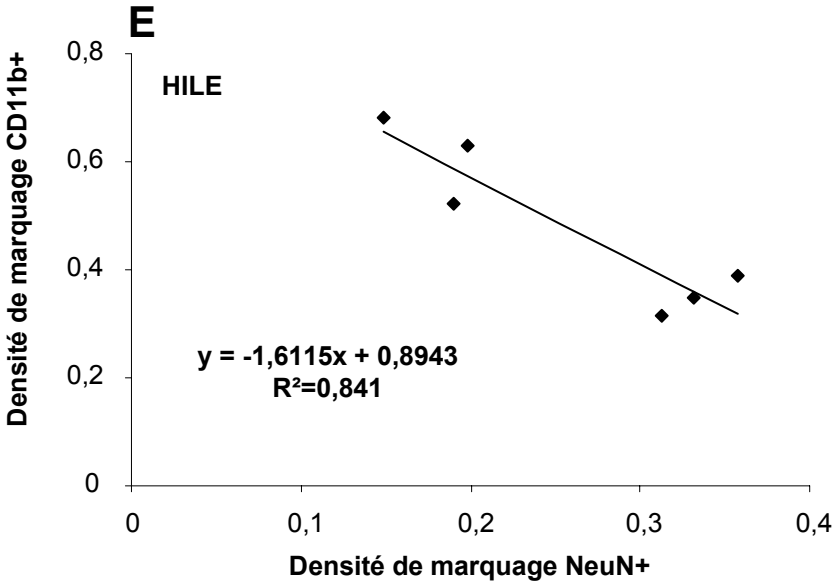


Figure R3 : Corrélation entre les dommages tissulaires et la réactivité de la microglie dans les cerveaux de rats ayant développés un *SE* 15 jours auparavant

Images mosaïques reconstruites des cerveaux de rats TN (**A** et **B**) et de rats 15j/PiloSE (**C** et **D**) montrant les cellules NeuN-positives d'une part (**A** et **C**) et les cellules CD11b-positives (CD11b, marqueur de cellules microgliales) d'autre part (**B** et **D**). Les dommages tissulaires en dehors de l'hippocampe dans le cortex piriforme (CP) et le thalamus dorsal (Thal D) (**C**) sont caractéristiques du *SE* induit par la pilocarpine. La densité de cellules microgliales est très importante dans les zones où la perte de neurones est sévère. Dans le hile, il existe une corrélation négative avec un coefficient de détermination de 0,841 entre la densité de neurones et la densité de microglie (**E**). Barre de mesure : A, 1 mm.
Abréviations :TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine, CP, cortex piriforme; Thal D, Thalamus dorsal.

I.A.4. Synthèse et éléments de discussion

L'induction expérimentale du *SE* par la pilocarpine chez le rat provoque ainsi une ré-organisation structurale de l'hippocampe assez similaire à celle observée sur les pièces réséquées de patients atteints d'EPLT qui présentent une sclérose de l'hippocampe. Toutefois, une comparaison plus détaillée des lésions révèle certaines disparités entre l'homme et l'animal. En effet, chez le rat rendu épileptique par la pilocarpine, les lésions ne sont pas circonscrites à l'hippocampe, contrairement à ce qui est observé dans l'EPLT, mais s'étendent également à des aires en dehors de l'hippocampe. A l'heure actuelle, les rongeurs rendus épileptiques ne permettent pas de modéliser à l'identique la symptomatologie humaine, quel que soit le mode d'induction expérimentale utilisé. Toutefois, si d'un point de vue histopathologique, la dégénérescence n'est pas aussi sélective dans l'hippocampe de rat rendu épileptique par la la pilocarpine que ce qui a été observé chez l'homme, on retrouve bien une sclérose de l'hippocampe, caractérisée par une diminution de volume, une perte de neurones et une gliose essentiellement à composante microgliale.

Chez l'homme, l'atrophie de l'hippocampe est généralement symptomatique des EPLT pharmacorésistantes [258]. Elle est la signature d'une sclérose de l'hippocampe, et peut être détectée par imagerie médicale [68]. Quelques études ont tenté de mettre en évidence une atrophie de l'hippocampe chez le rat rendu expérimentalement épileptique en utilisant les mêmes techniques d'imagerie. Ainsi, un hypersignal T2 est détecté dans l'hippocampe de rat grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) dès 2 jours après *SE* induit par le traitement à base de lithium et de pilocarpine. L'hypersignal devient intense 7 jours après *SE* et est maintenu jusqu'à 9 semaines au moins après *SE* [238]. Il est néanmoins très difficile de déterminer la nature histo-pathologique de cet hypersignal, dans la mesure où, avec la technique d'IRM, l'amplitude du signal est associée à la teneur du tissu en eau et à la mobilité des molécules d'eau. Plusieurs événéments histo-pathologiques, tels que la gliose, la perte des neurones ou encore un œdème, peuvent entraîner des variations d'amplitude du signal. Le maintien de l'hypersignal T2 dans l'hippocampe est généralement associé à une gliose réactionnelle maintenue sur le long terme dans cette structure. Deux études indiquent que l'hippocampe est atrophié chez le rat aussi bien 10 jours après *SE* induit par l'acide kaïnique [323], que 60 jours après *SE* induit par la pilocarpine [196]. Dans cette dernière étude, la diminution de la surface de l'hippocampe est estimée à environ -30% par rapport à celle des rats témoins. A notre connaissance, notre étude est la première à montrer, à partir d'une méthode d'analyse fondée sur la mesure de la surface de l'hippocampe sur des coupes de cerveaux perfusés et colorés au crésyl violet, que la surface de l'hippocampe dorsal du rat est reduite d'environ 25%, quinze jours après *SE* induit par la pilocarpine. Ceci suggère que

l'atrophie de l'hippocampe est établie dès la fin de la période d'épileptogenèse induite par la pilocarpine.

Quelles pourraient être les conséquences fonctionnelles d'une telle atrophie de l'hippocampe ? L'hippocampe est une région du cerveau impliquée dans les processus de mémorisation spatiale chez le rat. Une atrophie de cette structure pourrait altérer les perfomances mnésiques. Ces performances sont en effet fortement réduites dans le test d'orientation spatiale (test de la piscine de Morris) chez les rats ayant développé un *SE* induit par la pilocarpine 30 à 40 jours avant le test [196]. Chez le patient atteint d'EPLT, un déficit cognitif progressif est également observé [108].

Dans notre étude, la perte des neurones est sélective de certaines régions de l'hippocampe du rat 15 jours après *SE*. En effet, tout comme ce qui a été caractérisé chez l'homme [48,51,227,284], le hile et la région CA3 sont particulièrement lésés dans l'hippocampe atrophié du rat rendu épileptique alors que les cellules en grain du GD sont épargnées. Néanmoins, l'ampleur des lésions est moindre dans l'hippocampe de rat rendu épileptique par rapport à ce qui a été observé chez les patients atteints d'EPLT présentant une sclérose de l'hippocampe. Chez ces patients, bien que les études présentent certaines dissimilitudes, la perte des neurones de CA3 a été estimée au moins à -50% [51,227], alors que, chez le rat rendu épileptique par la pilocarpine, elle est estimée à environ -36%. Ces disparités sont particulièrement importantes dans CA1, puisque les études sur l'homme sont convergentes et montrent une perte massive (environ -80%) des neurones de cette région [51,227], alors que, dans notre étude, cette perte est estimée seulement à 21,5% chez le rat rendu épileptique par la pilocarpine. Chez le rat rendu épileptique par le traitement à base de lithium et de pilocarpine, la perte des neurones est également plus importante dans le hile et dans CA3 par rapport à celle estimée dans CA1 [238]. Par ailleurs, il est peu probable que la lésion des neurones de CA1 évolue au long cours, puisque, 6 mois après *SE* induit par stimulation électrique de l'amygdale chez le rat, aucune dégénérescence des neurones n'est détectée dans l'hippocampe [221], ce qui suggère que les processus neurodégénératifs de l'hippocampe s'opèrent principalement au cours de l'épileptogenèse. Ainsi, les lésions de l'hippocampe de rat rendu épileptique ne sont pas entièrement identiques à celles observées sur les pièces opératoires de patients atteints d'EPLT. Néanmoins, la perte des neurones est particulièrement sévère dans le hile de rat rendu épileptique par la pilocarpine. Nous avons précédemment identifié que cette perte concerne principalement les cellules moussues glutamatergiques chez le rat rendu épileptique par la pilocarpine [181], ce qui correspond à ce qui a été observé chez l'homme [27]. La perte des cellules moussues serait alors responsable de la mise en place de réseaux neuronaux hyperexcitables [269] (voir aussi paragraphe I.A.2.c de l'historique scientifique).

Nos résultats sur la cicatrice gliale reflètent bien ce qui a été observé chez l'homme (voir paragraphe I.A.2c. de l'historique scientifique) et sont conformes à ce qui a été mis en évidence chez le rat rendu épileptique par le traitement à base de lithium et de pilocarpine [238]. Les rôles joués par cette cicatrice gliale sur la transformation épileptique de l'hippocampe demeurent, à ce jour, inconnus. Une des hyptohèses avancées est que l'accumulation d'astrocytes réactifs dans le hile constitue un environnement non permissif contraignant les fibres moussues à s'acheminer de manière aberrante vers les neurones granulaires [130]. Par ailleurs, les astrocytes réactifs de l'hippocampe atrophié présenteraient une moindre capacité de capture du glutamate extracellulaire [52], ce qui contribuerait à augmenter le taux extracellulaire de ce neurotransmetteur excitateur. Toutefois, les astrocytes réactifs pourraient jouer un rôle tout autre dans l'hippocampe, en favorisant la survie des neurones avoisinants par la libération de nombreux facteurs neurotrophes [130]. Dans notre étude, l'astrocytose réactionnelle est accompagnée d'une importante activation de la microglie. Chez les patients atteints d'EPLT, la composante microgliale de la cicatrice gliale est encore mal caractérisée et les données sont contradictoires [16 ,17]. En culture, les cellules activées de la microglie sécrétent des facteurs neurotoxiques [130]. Dans le hile des rats rendus épileptiques par la pilocarpine, plus la lésion est importante, plus il y a une accumulation de cellules microgliales activées. Ceci suggère que les cellules microgliales activées participent à générer un environnement toxique pour les neurones. Si tel était le cas, il est fort vraisemblable que l'accumulation de cellules microgliales activées précède la mort des neurones vulnérables.

Nous avons alors étudié la cinétique de mise en place des différents événements cellulaires (mort neuronale, astrocytose, microgliose) dans l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse et tenter d'établir des liens de causalité entre eux.

I.B. CINETIQUE DE MISE EN PLACE DE LA DEGENERESCENCE NEURONALE ET DE LA GLIOSE REACTIONNELLE DANS L'HIPPOCAMPE A LA SUITE D'UN *STATUS EPILEPTICUS* INDUIT PAR LA PILOCARPINE

I.B.1. Cinétique de mise en place de la mort des neurones vulnérables de l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse

La coloration au Fluorojade B est une technique de coloration histologique qui marque les neurones en dégénérescence [253]. Nous avons choisi cette technique histologique pour approcher au mieux la dégénérescence neuronale de l'hippocampe à la suite du *SE* induit par la pilocarpine, car elle semble plus appropriée qu'une estimation basée sur la densité de cellules NeuN-positives pour détecter le plus précocément possible les neurones dégénérescents. Les hippocampes (IA : + 5,70 selon l'atlas de Paxinos et Watson, édition de 1998) de rats témoins naïfs (TN) et de rats ayant développé un *SE* 8 h (8 h/ PiloSE), 1 jour (1 j/ PiloSE), 3 jours (3 j/ PiloSE) et 15 jours (15 j/ PiloSE) auparavant sont colorés au Fluorojade B. Globalement, la dégénérescence des neurones est observée en premier lieu dans le hile, puis se propage dans les régions de la CA sans affecter le GD. Dans le hile, aucun marquage n'est observé chez les rats TN (***Figure R4A***) et les rats 8 h/ PiloSE (*donnée non illustrée*). En revanche, un marquage intense est observé chez les rats 1 j/ PiloSE, 3 j/ PiloSE et un marquage important mais moins intense est observé chez les rats 15 j/ PiloSE (***Figures R4B, R4C, R4D***). Ceci signifie que dans le hile, les processus neurodégénératifs s'opèrent précocément (entre 8 h et 24 h à la suite du *SE*) et sont maintenus au cours de l'épileptogenèse (jusqu'à 15 jours après *SE*). Dans la région CA1, aucun marquage n'est observé ni chez les rats TN (***Figure R4E***) ni chez les rats 8 h/ PiloSE (*donnée non illustrée*). Un faible marquage (quelques cellules dispersées) est observé chez les rats 1 j/ PiloSE (***Figure R4F***) et chez les rats 15 j/ PiloSE (***Figure R4H***), alors qu'un intense marquage est observé chez les rats 3 j/ PiloSE (***Figure R4G***). Ceci signifie dans CA1, le pic apparent de neurodégénérescence est situé environ 3 j après *SE*.

De ces résultats expérimentaux, on peut déduire que la perte des neurones observée dans certaines régions de l'hippocampe atrophié 15 jours après *SE* résulte bien de la mise en place progressive de processus neurodégénératifs. C'est dans les zones les plus lésées que se mettent en place le plus précocément les processus neurodégénératifs (dès 1 jour après *SE*) qui sont maintenus toute la durée de l'épileptogenèse. En revanche, dans CA1, région plus résistante que le hile, la neurodégénérescence prend toute son ampleur plus tardivement (3 jours après *SE*) et n'est pas maintenue aussi élevée pendant l'épileptogenèse.

La gliose réactionnelle correspond non seulement à l'activation d'astrocytes (astrocytose), mais aussi celle des cellules microgliales (microgliose). Nous avons ensuite cherché à savoir si une activation des cellules microgliales précédait ou succédait la mise en place de la neurodégénérescence dans l'hippocampe.

I.B.2. Cinétique de mise en place de la microgliose réactionnelle dans l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse

CD11b a été détecté sur des coupes de cerveaux perfusés de rats TN, de rats 1 j/ PiloSE, 3j / PiloSE et 15j / PiloSE. A l'état basal, les cellules CD11b positives apparaissent faiblement marquées et sont distribuées dans l'ensemble de l'hippocampe (***Figures R4I, R4J***). Elles présentent des ramifications nombreuses et fines (***Figures R4I, R4J***). Un jour après *SE*, elles apparaissent plus fortement marquées et sont moins nombreuses dans le neuropile (***Figures R4K, R4L***). Elles présentent un corps cellulaire hypertrophié et de courtes ramifications (morphologie « hypertrophiée ») (***Figures R4K, R4L***). Par ailleurs, de nombreuses cellules de forme ronde ou amiboïde sont observées 1 jour après *SE* (ce point sera détaillé par la suite) (***Figure R4K***). Trois jours après *SE*, des cellules fortement marquées sont agglutinées dans le hile, dans la couche moléculaire interne du GD, dans le *SLMo* (***Figure R4M***) et dans différentes couches de CA1 (***Figure R4N***). Elles présentent toutes une morphologie « hypertrophiée », hormis quelques cellules du *stratum radiatum* de CA1 qui présentent une morphologie longiligne (***Figure R4N***). Enfin, 15 jours après *SE*, l'accumulation des cellules microgliales activées est maintenue dans le hile (***Figure R4O***), et dans la région CA1 (de la couche pyramidale au *SLMo*) (***Figure R4P***), alors que dans les autres régions de l'hippocampe, l'aspect morphologique de la microglie est revenu à celui décrit dans les conditions basales. Dans les zones de maintien, la majorité des cellules présentent une morphologie « hypertrophiée » (***Figure R4R***), alors que les cellules microgliales activées présentent une morphologie longiligne dans le *stratum radiatum* de CA1, où elles émettent leurs longs prolongements vers le *SLMo* (***Figure R4P, R4S***).

La densité du marquage CD11b a été mesurée dans le hile et dans la région CA1 des hippocampes de rats TN, de rats 3 h/ PiloSE, 1 j/ PiloSE, 3 j/ PiloSE, 4 j/ PiloSE et enfin 15 j/ PiloSE. <u>Dans le hile</u>, la densité de marquage mesurée chez les rats 3 h/ PiloSE est globalement la même que celle déterminée chez les TN (***Figure R4Q***). La morphologie des cellules CD11b positives est toutefois modifiée dès 8 h après *SE* (***Figure R6E***) sans que cela affecte la densité de marquage CD11b (*donnée non illustrée*), qui, en revanche, augmente significativement 1 jour après *SE* (***Figures R4K, R4Q***). Cette densité élevée est maintenue dans le hile jusqu'à 15 jours après *SE* (+110 % environ par rapport aux rats TN) (***Figures***

R4O, R4Q). Dans CA1, la cinétique d'activation microgliale est assez différente de celle observée dans le hile. La densité de marquage CD11b mesurée chez les rats 3 h/ PiloSE correspond également à celle mesurée chez les rats TN (***Figure R4Q***). En revanche, bien que la densité de marquage soit considérablement augmentée chez les rats 1 j/ PiloSE (+ 360% par rapport aux rats TN), le maximum est mesuré chez les rats 3 j/ PiloSE (+670% par rapport aux rats TN) (***Figure R4Q***). Dès le jour suivant (4 j/ PiloSE), la densité de marquage CD11b diminue mais reste supérieure à celle mesurée chez les rats TN (+ 400% environ par rapport aux rats TN). Par ailleurs, cette densité est maintenue élevée jusqu'à 15 jours après *SE* (+425% par rapport aux rats TN) (***Figure R4Q***).

Ces résultats expérimentaux indiquent que : 1) la réactivité microgliale précède la mise en place des processus neurodégénératifs (observables par la coloration au Fluorojade B) aussi bien dans le hile que dans CA1, 2) dans ces deux régions, le maximum d'accumulation de cellules microgliales activées est atteint lorsque la neurodégénérescence prend toute son ampleur (dès 1 jour après *SE* pour le hile et 3 jours après *SE* pour CA1), 3) l'ampleur de l'activation microgliale n'est pas un indice de l'ampleur de la perte des neurones, et enfin 4) les cellules microgliales activées n'adoptent pas la même morphologie dans CA1 que dans le hile.

I.B.3. Cinétique de mise en place de l'astrocytose dans l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse

La GFAP (une protéine spécifique des astrocytes) a été détectée sur des coupes de cerveaux perfusés de rats TN, de rats 1 j/ PiloSE et 3 j/ PiloSE. A l'état basal, les cellules marquées sont distribuées dans l'ensemble de l'hippocampe. A la suite du *SE*, la réponse astrocytaire est différente selon les régions de l'hippocampe. Dans le hile, le marquage le plus dense est observé 3 j après *SE* (***Figure R5E***), ce qui reflète que l'astrocytose, bien qu'initiée 1 jour après *SE (**Figure R5C**)*, y prend toute son ampleur plus tardivement. Dans CA1, l'activation des astrocytes est maximale dès 1 jour après *SE* (***Figure R5D***), et se maintient 3 jours après *SE* (***Figure R5F***), en particulier dans les *stratum oriens et stratum pyramidalis*. En revanche, les astrocytes apparaissent moins hypertrophiés 3 jours après *SE* dans le *stratum radiatum* de CA1 (***Figures R5D, R5F***).

Ainsi, l'astrocytose ne se met pas en place au même moment dans le hile et dans CA1. Dans le hile, elle succède clairement à la microgliose et à la mise en place de la neurodégénérescence, alors que dans CA1, elle succède à la microgliose mais elle précède la mise en place de la neurodégénérescence.

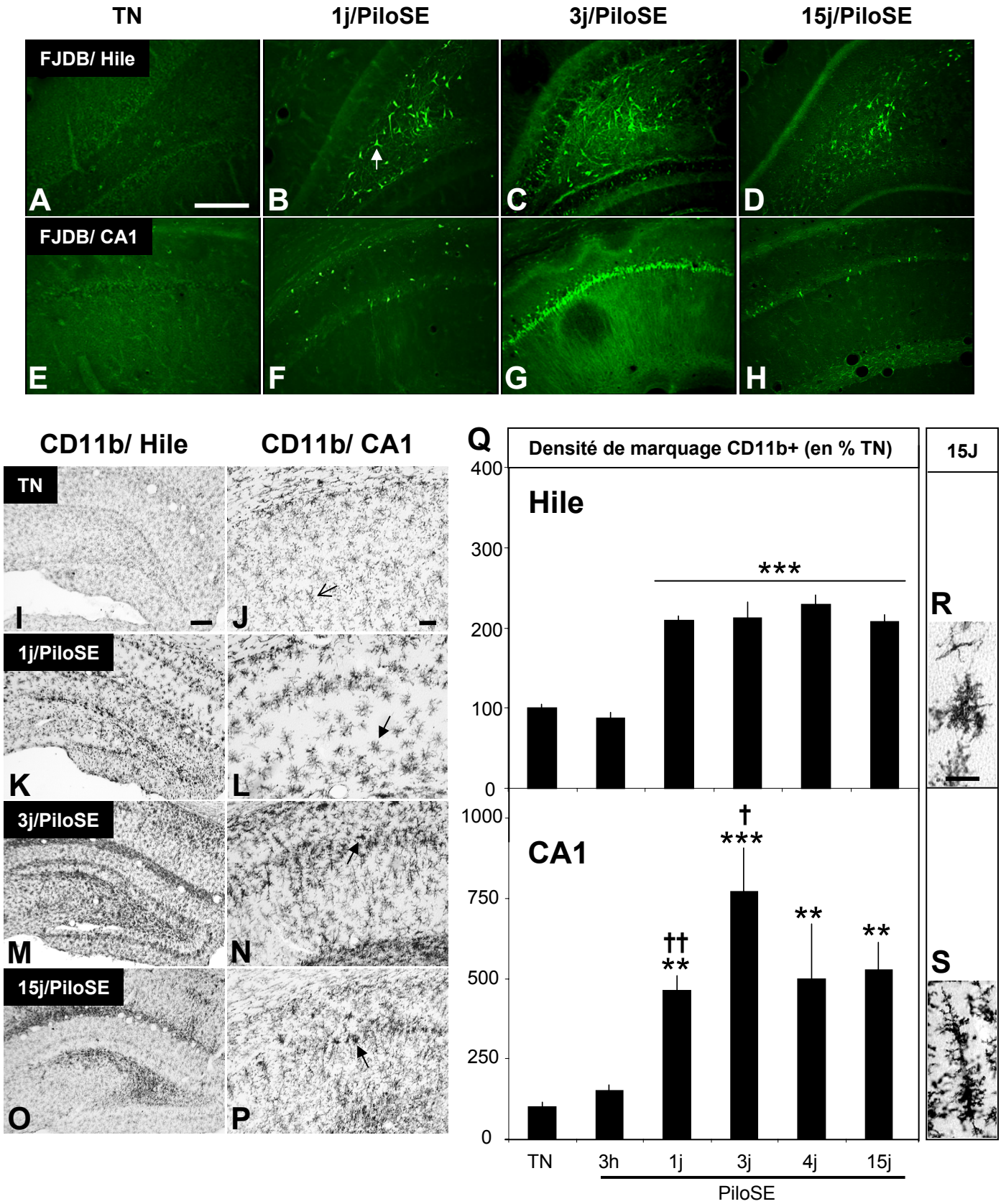


Figure R4 : Cinétique de mise en place de la neurodégénérescence et de la microgliose réactionnelle à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine

(légende voir page suivante)

Figure R4 : Cinétique de mise en place de la neurodégénérescence et de la microgliose réactionnelle à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine

Coupes de cerveaux perfusés après coloration au Fluorojade B (marqueur de neurones dégénérescents) montrant les régions du hile (**A** à **D**) et CA1 (**E** à **H**) de l'hippocampe de rats TN (**A** et **E**), et de rats 1j/PiloSE (**B** et **F**), 3j/PiloSE (**C** et **G**) et 15j/PiloSE (**D** et **H**). Un jour après *SE*, le hile présente de nombreux neurones dégénérescents (flèche blanche, **B**). Photographies au microscope montrant les cellules CD11b-positives (CD11b, marqueur de cellules microgliales) au hile (grossissement X4) (**I**, **K**, **M**, **O**) et de CA1 (grossissement X10)(**J**, **L**, **N**, **P**) de rats TN (**I** et **J**), et de rats 1j/PiloSE (**K** et **L**), 3j/PiloSE (**M** et **N**) et 15j/PiloSE (**O** et **P**). Dans l'hippocampe des rats TN, les cellules CD11b-positives sont faiblement marquées et présentent de nombreuses fines ramifications (tête de flèche vide; **J**), alors que dans les hippocampes des rats 1j/PiloSE, 3j/PiloSE et 15j/PiloSE, elles sont fortement marquées et les ramifications se sont rétractées (têtes de flêches pleines; **L**, **N** et **P**). La densité de cellules CD11b positives est représentée en fonction des différents groupes (TN, n=4; 3h/PiloSE, n=2; 1j/PiloSE, n=3; 3j/PiloSE, n=3 et 15j/PiloSE, n=3) au niveau du hile et de CA1 (**Q**). Test statistique ANOVA I suivie d'un test de Fisher LSD : **, p<0,01, ***, p<0,001 en comparaison des rats témoins naïfs; **†**, p<0,05; **††**, p<0,01, par rapport au groupe précédent. Photographies au microscope (grossissement X 40) montrant la morphologie des cellules CD11b positives accumulées dans le hile (**R**) et dans la région CA1 (**S**) des rats 15j/PiloSE. Barres de mesure: A, 100 µm; I, 150 µm; J, 50 µm; R, 25 µm.

Abréviations : TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; FJDB, Fluorojade B.

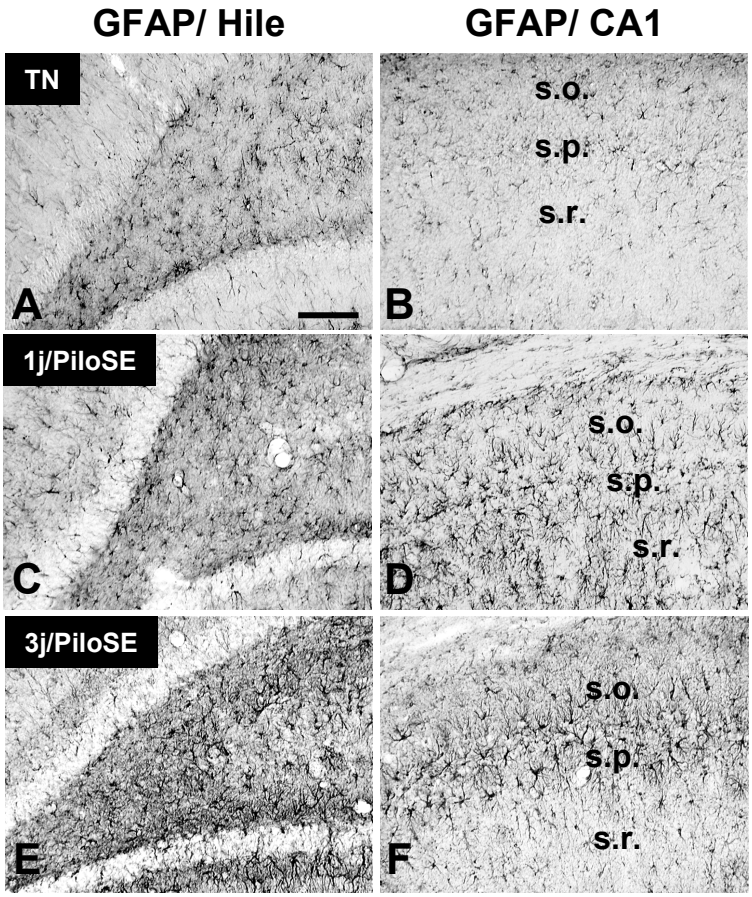


Figure R5 : Cinétique de mise en place de l'astrocytose à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine

Cellules GFAP-positives (GFAP, marqueur de astrocytes) dans le hile (grossissement X10) (**A**, **C**, **E**) et de CA1 (grossissement X10)(**B**, **D**, **F**) de rats TN (**A** et **B**), et de rats 1j/PiloSE (**C** et **D**) et 3j/PiloSE (**E** et **F**). Dans les hippocampes de rats TN, les cellules GFAP-positives présentent de fines ramifications (**A** et **B**). Dès 1 jour, les cellules GFAP-positives sont plus abondantes principalement au niveau de la région CA1 (**D**). Les cellules GFAP-positives qui présentent un corps cellulaire hypertrophié s'accumulent dans le hile (**E**) et dans la région CA1 (**F**) 3 jours après *SE*. Dans le *stratum radiatum*, on observe moins d'astrocytes réactifs 3j après SE qu'au temps 1j après *SE* (**F**). Barres de mesure: A, 100 µm.
Abréviations : TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; GFAP, Protéine acide fibrillaire gliale; s.o., *stratum oriens*; s.p., *stratum pyramidalis*; s.r., *stratum radiatum*.

I.B.4. Synthèse et éléments de discussion

Dans notre étude, les processus neurodégénératifs s'opèrent en premier lieu dans le hile et s'étendent par la suite aux autres régions telles que CA1, conformément à ce qui a préalablement été observé chez les rats soumis à un *SE* expérimental [116,312]. En effet, les neurones dégénérescents sont détectables dans le hile dès 12 h après *SE* induit par un traitement à base de lithium et de pilocarpine et une dégénérescence neuronale est encore observée dans cette région 6 jours après *SE* [312]. En revanche, dans CA1, les neurones en dégénérescence ne sont détectables qu'à partir de 24h après *SE* ; de nombreux neurones sont en dégénérescence 3 jours et 6 jours après *SE* [312]. Notre étude permet en plus d'affirmer que la dégénérescence des neurones reste assez importante uniquement dans le hile jusqu'à la fin de l'épileptogenèse.

Une microgliose réactionnelle est observée dans l'hippocampe après *SE* induit par la pilocarpine [136,240], ou par acide kaïnique [106,302], ou encore par stimulation électrique de l'hippocampe ventral [55,66]. En particulier, une activation précoce de la microglie (entre 3 et 6 h après *SE*) s'opère dans le GD du rat après *SE* induit par la pilocarpine et les cellules microgliales activées présentent une morphologie « hypertrophiée » avec de courts prolongements [136]. La densité microgliale, bien que diminuée, reste élévée dans le hile plusieurs semaines après *SE* induit par la pilocarpine [136] ou par l'acide kaïnique [106] ou encore par stimulation électrique de l'hippocampe ventral [28,66]. Notre étude confirme ces observations et apporte des précisions quant à l'intensité de l'activation de la microglie dans les différentes régions de l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse et sa cinétique de mise en place par rapport à celle de la neurodégénérescence. En effet, dans notre étude, nous ne détectons aucun neurone dégénérescent dans le hile 8 h après *SE*, alors que les cellules microgliales y ont déjà amorcé leur activation. En outre, de rares neurones dégénérescents sont observables dans CA1 1 jour après *SE* alors que la densité de marquage CD11b y est déjà fortement augmentée (+ 360% par rapport aux rats TN). Ceci indique que l'activation de la microglie précéde aussi bien dans le hile que dans CA1 la mise en place de la neurodégénérescence. Par ailleurs, l'activation précoce de la microglie résidente ne semble en elle-même pas ou peu délétère pour les neurones environnants. En revanche, il se pourrait que l'amplification de l'activation microgliale qui prend place entre 1 jour et 3 jours après le *SE* contribue à la dégénérescence soutenue des neurones de l'hippocampe. C'est en effet quand l'activation de la microglie est maximale que les pics de neurodégénérescence sont observés, aussi bien dans le hile que dans CA1. Il se produirait donc entre 1 jour et 3 jours une

modification de la fonction de la microglie qui passerait d'un statut peu toxique avant 1 jour à un statut fortement délétère à la survie des neurones au-delà de 1 jour après *SE*.

L'astrocytose réactionnelle pourrait jouer un rôle sur la robustesse des neurones. En effet, dans notre étude, l'astrocytose se met en place plus rapidement dans CA1 que dans le hile. Dans CA1, les astrocytes réactifs pourraient libérer des facteurs neurotrophes qui retardent la mort des neurones, en particulier l'érythropoïétine [181]. Pourquoi l'astrocytose est-elle retardée dans le hile par rapport à la région CA1 ? Il est possible que la mort des astrocytes du GD, mise en évidence récemment 1 jour après *SE* [29,136], contribue au retard de déclenchement de l'astrocytose dans le hile.

La neurodégénérescence n'est pas le seul événement affectant la population de neurones à la suite d'un *SE*. En effet, la prolifération des précurseurs neuronaux de la couche sous-granulaire du GD est augmentée [208], ce qui suggère la mise en place de mécanismes de compensation pour remplacer les neurones endommagés. Dans le hile, il se pourrait que l'activation de la microglie participe à modérer l'augmentation de la neurogenèse, comme cela a été précédemment montré [66,179]. Il est également possible que l'activation de la microglie perturbe les molécules de signalisation qui orientent la migration des neurones néoformés, dont la conséquence serait la migration ectopique de ces neurones observée dans le hile [208]. Quant aux neurones nouvellement formés qui auraient correctement intégré la couche granulaire du GD, il se pourrait que l'activation de la microglie dans la couche moléculaire interne (où sont localisées les zones proximales des dendrites apicales des cellules en grain du GD) participe à l'accélération de leur intégration fonctionnelle dans le GD [205].

Quels seraient les mécanismes qui se dérouleraient dans le hile 1 jour après *SE* et qui provoquerait la mort des cellules de cette région ? Un jour après *SE* induit par la pilocarpine nous avons mis en évidence un événement singulier de la région du GD. Cet événement est la présence de cellules myléoïdes de forme ronde, qui est décrite plus loin (voir paragraphe I.C. des résultats) et qui sera discuté par la suite.

I.C. MISE EN EVIDENCE DE L'INFILTRATION DE MONOCYTES DANS LE PARENCHYME DE L'HIPPOCAMPE A LA SUITE D'UN *STATUS EPILEPTICUS* INDUIT PAR LA PILOCARPINE

Nous avons mis en évidence une importante réactivité de la microglie dans l'hippocampe du rat qui se maintient sur le long terme dans certaines régions à la suite du *SE* induit par la pilocarpine. Cette réactivité microgliale correspond en partie à la transformation morphologique des cellules microgliales résidentes qui consiste en l'épaississement des prolongements cellulaires. Dès le premier jour à la suite du *SE*, nous avons également mis en évidence la présence de nombreuses cellules rondes, de type amiboïde, qui exprime le marqueur de surface CD11b. Ces cellules amiboïdes peuvent correspondre soit à une modification de la microglie résidente (cela correspondrait à une étape transitoire de la transformation morphologique de la microglie au cours du processus d'activation), soit à des monocytes et/ou macrophages et/ou cellules périvasculaires qui auraient pénétré le parenchyme de l'hippocampe à la suite du *SE* (voir paragraphe II.A.6 de l'historique scientifique). L'infiltration de monocytes et/ou de macrophages des leptoméninges reste encore à démontrer clairement dans l'hippocampe à la suite du *SE*. Nous avons donc cherché à savoir si des cellules immunocompétentes, qu'elles soient des monocytes circulants, des cellules périvasculaires ou des macrophages de leptoméninges, infiltraient le parenchyme de l'hippocampe à la suite du *SE*. Nous nous sommes fondés sur des critères morphologiques, sur une signature moléculaire et sur des critères phénotypiques pour répondre à cette question.

I.C.1. Analyse morphologique des cellules CD11b-positives dans l'hippocampe à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine

Plusieurs formes de la microglie ont été identifiées dans le cerveau et chacune d'entre elles a été mise en relation avec un statut d'activation (voir paragraphe II.A.5 de l'historique scientifique). Toutefois, les concepts ont évolué, et la forme amiboïde qui était considérée comme un indice d'activation transitoire de la microglie résidente, est à présent mise en relation avec la présence dans le cerveau de cellules périvasculaires et/ou de macrophages (dérivant soit des monocytes circulants qui ont traversé la BHE, soit des leptoméninges après migration le long des espaces périvasculaires). Dans un premier temps, nous avons quantifié la présence de cellules immunocompétentes de forme amiboïde (ronde) dans l'hippocampe à la suite de la mise en place du *SE*.

La morphologie des cellules microgliales, détectées par le marqueur CD11b, est modifiée au cours de l'épileptogenèse. En effet, le marquage de CD11b est relativement faible dans les hippocampes de rats TN (***Figure R6A***) et les cellules qui apparaissent CD11b positives présentent des ramifications nombreuses et fines (***Figures R6B, R6C***) : ces caractéristiques sont celles de la forme quiescente de la microglie. En revanche, dès 8 h après *SE*, le marquage de CD11b gagne en intensité dans le hile (***Figure R6D***), et les cellules CD11b positives présentent une morphologie particulière avec un corps cellulaire hypertrophié et moins de ramifications (***Figures R6E, R6F***). De plus, les espaces intercellulaires apparaissent plus importants chez les rats 8 h/ PiloSE (***Figures R6E, R6F***) que chez les rats TN (***Figures R6B, R6C***), ce qui indique que les ramifications plus courtes observées à 8 h résultent vraisemblablement de leur rétraction survenue dans les premières heures de l'épileptogenèse. Ceci suggère que les processus d'activation de la microglie s'opèrent précocément à la suite du *SE*. Un jour après *SE*, on observe deux types de morphologie pour les cellules CD11b positives. Certaines cellules présentent une morphologie relativement similaire à celle observée 8h après *SE*, avec une hypertrophie du corps cellulaire encore plus marquée (***Figure R6H***), alors que d'autres ont une forme ronde (***Figure R6H***). Ces cellules rondes CD11b positives sont particulièrement abondantes dans le hile, dans la couche granulaire du GD (***Figure R6H***), et dans le *SLMo* (*donnée non illustrée*). On observe également ces cellules dans une moindre proportion dans CA1, en particulier dans les *stratum radiatum et stratum pyramidalis* (***Figure R6I,*** *flèche noire*). Trois jours après *SE*, il n'y a plus de traces de cellules rondes. Dans le hile, les cellules CD11b sont alors compactées et sont hypertrophiées (***Figure R6K***). En revanche, dans CA1, les cellules CD11b présentent une morphologie longiligne (***Figure R6L***), comme décrit précédemment (voir paragraphe I.B.2 des résultats). Ces cellules de la microglie longilignes sont observées à 15 jours au moins après *SE* dans le *stratum radiatum* de CA1.

Les cellules rondes CD11b de la région du GD (hile, couche granulaire et couche moléculaire) sont observées en abondance uniquement 1 jour après *SE* (environ 34 fois plus que pour les rats TN) (***Figure R6M***).

La présence transitoire des cellules rondes CD11b positives 1 jour après *SE* dans certaines zones du parenchyme de l'hippocampe est à corréler avec la forme amiboïde des cellules microgliales activées (voir paragraphe II.A.5 et II.A.6. de l'historique scientifique). Si ces cellules correspondent à la présence de cellules immunocompétentes autre que ceux de la microglie résidente, cela signifierait que de nombreuses cellules en provenance des espaces périvasculaires (cellules périvasculaires ou monocytes infiltrants) ou des leptoméninges (macrophages) aient pénétré le parenchyme de

l'hippocampe pour s'accumuler principalement dans le hile, une région proche des leptoméninges (bordure ventrale de la couche moléculaire du GD) et des espaces périvasculaires du *SLMo* (bordure dorsale de la couche moléculaire du GD).

Il est en revanche impossible sur la base de la détection immunohistochimique de CD11b de confirmer cette explication, puisque le marqueur CD11b ne permet pas de distinguer les cellules de la microglie résidentes des cellules immunocompétentes qui auraient infiltré le parenchyme de l'hippocampe (voir paragraphe II.A.4 de l'historique scientifique). Nous avons donc décidé d'approfondir la caractérisation des cellules rondes CD11b par la détection d'antigènes de surface spécifiques des monocytes.

I.C.2. Recherche de la présence de cellules CD14 positives dans l'hippocampe à la suite du *status epilepticus* induit par la pilocarpine

Le marqueur de surface CD14 est le plus pertinent pour tenter de déterminer si les cellules rondes CD11b sont des cellules microgliales résidentes (CD14 négatives) ou des cellules d'un autre type telles que les monocytes, les macrophages des leptoméninges, ou encore les cellules périvasculaires (toutes trois CD14 positives) [101](voir paragraphe II.A.4 de l'historique scientifique). Nous avons alors procédé à la double immunodétection de l'antigène CD11b (anticorps couplé à un fluorochrome vert) et de l'antigène CD14 (anticorps couplé à un fluorochrome rouge) sur les coupes de cerveaux de rats perfusés.

Aucune cellule CD14 positive n'a été détectée par immunofluorescence dans les hippocampes de rats témoins naïfs (*donnée non illustrée*). En revanche, des cellules CD14 positives sont observées dans les hippocampes de rats ayant développé 1 jour auparavant un *SE* (***Figures R7B, R7E***). Ces cellules sont localisées dans la bordure leptoméningeale de la couche moléculaire externe du GD (***Figures R7B, R7C****, têtes de flèches vides*), mais également dans le parenchyme de la couche moléculaire du GD et du hile (***Figures R7B, R7E***). 93% des cellules rondes CD11b positives localisées dans le parenchyme de l'hippocampe 1 jour après *SE* sont également CD14 positives (***Figures R7C, R7F****, têtes de flèches pleines*). Par ailleurs, dès 4 jours après *SE*, nous n'avons observé ni cellules rondes CD11b positives ni cellules rondes CD14 positives (*donnée non illustrée*).

Ces résultats expérimentaux révèlent qu'aucune cellule périvasculaire CD14 positive n'est détectée dans l'hippocampe à l'état basal. Les cellules CD14 positives qui pénétrent le parenchyme de l'hippocampe sont alors soit des monocytes circulants, soit des macrophages issus des leptoméninges et qui ont migré le long des espaces périvasculaires. Enfin, la détection de CD14 est transitoire, ce qui suggère la présence de

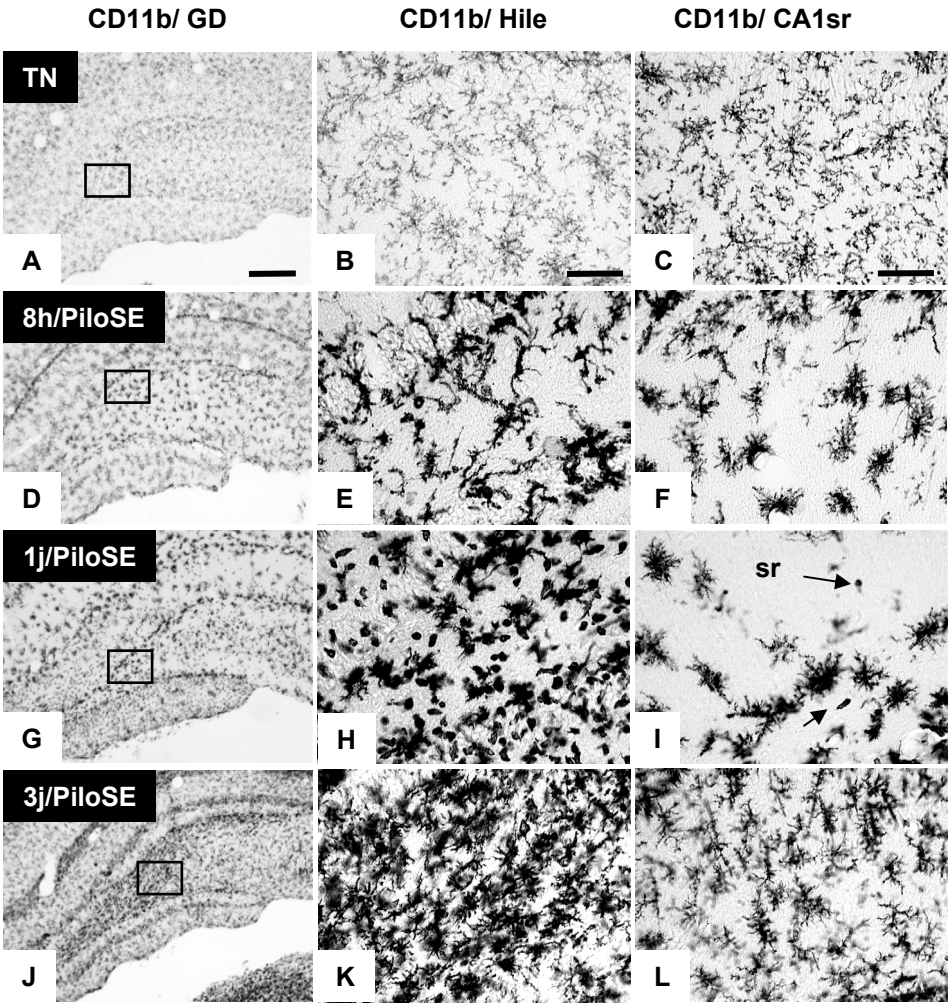
monocytes/ macrophages est transitoire dans le parenchyme de l'hippocampe ou que la différenciation des monocytes/macrophages en cellules de type microglial est accompagnée d'une perte du phénotype CD14.

I.C.3. Expression des gènes des chimiokines dans l'hippocampe à la suite du *status epilepticus* induit par la pilocarpine

Dans le cas où il y aurait pénétration dans le parenchyme de monocytes et/ou de macrophages, il faudrait que l'hippocampe émette au préalable des signaux moléculaires exerçant un chimiotactisme positif sur les monocytes et les macrophages [21]. Nous avons alors recherché si les ARNm des chimiokines MCP-1, MIP-1α et MIP-1β étaient synthétisés dans l'hippocampe, et cela précocément à la suite du *SE*.

Nous avons mesuré les taux en ARNm de MCP-1, de MIP-1α et de MIP-1β dans l'hippocampe de rats TN, et de rats 8 h/ PiloSE, 1 j/ PiloSE, et 4 j/ PiloSE. Le *SE* induit par la pilocarpine entraîne une augmentation transitoire de la quantité d'ARNm dans l'hippocampe de MCP-1, de MIP-1α et de MIP-1β (***Figures R8A, R8B, R8C***). Le pic apparent est localisé à 1 jour après *SE* pour MCP-1 (environ 1246 fois plus que dans l'hippocampe des rats TN), la quantité de son ARNm étant déjà fortement augmentée dès 8 h après *SE* (environ 680 fois plus que dans les TN) (***Figure R8A***). La quantité des ARNm de MIP-1α et de MIP-1β est également rapidement augmentée augmentée dans l'hippocampe à la suite du *SE*, puisque les pics apparents sont observés 8 h après *SE* (environ 284 et 423 fois plus respectivement en comparaison des rats TN).

La quantité d'ARNm de MCP-1, de MIP-1α et de MIP-1β est donc considérablement augmentée dans l'hippocampe dès les premières heures à la suite du *SE*, ce qui suggère fortement une activation de la transcription de leurs gènes respectifs. Les cellules de l'hippocampe émetteraient alors un signal qui exerce un chimiotactisme positif sur les monocytes et les macrophages (voir paragraphe II.C.1 de l'historique scientifique). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle les cellules amiboïdes, observées dans le GD 1 jour après *SE*, sont soit des monocytes, soit des cellules périvasculaires ou soit des macrophages dérivés des leptoméninges, qui ont pénétré dans le parenchyme cérébral.



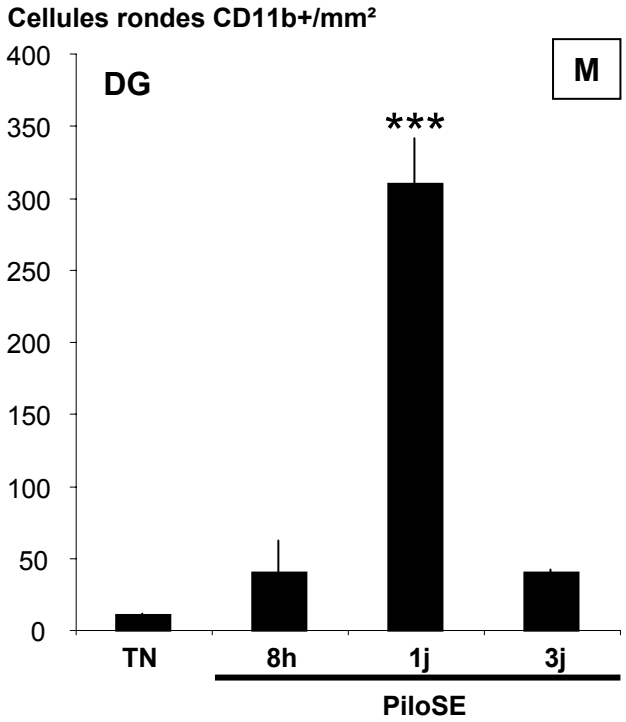


Figure R6 : Analyse morphologique des cellules CD11b positives à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine (*légende voir page suivante*)

Figure R6 : Analyse morphologique des cellules CD11b positives à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine

Photographies au microscope montrant les cellules CD11b positives (CD11b, marqueur de cellules immunocompétentes) au niveau des régions du hile (**A**, **B, D, E, G, H, J, K**) et de *stratum radiatum* de CA1 (**C, F, I, L**) des hippocampes de rats TN (**A**, **B**, **C**) et de rats 8h/PiloSE (**D**, **E**, **F**), 1j/PiloSE (**G**, **H**, **I**) et enfin 3j/PiloSE (**J**, **K**, **L**). Dans le hile et le *stratum radiatum* de CA1 chez les rats TN, les cellules CD11b positives sont faiblement marquées, et présentent de nombreuses ramifications fines (**B** et **C**). Dans le hile des rats 8h PiloSE, elles apparaissent plus fortement marquées et présentent moins de ramifications (**E**). Dans le *stratum radiatum* de CA1 des rats 8h/PiloSE, les cellules CD11b positives présentent des corps cellulaires gonflés et des ramifications plus courtes (**F**). Notez qu'un jour après *SE*, de nombreuses cellules CD11b positives de forme ronde sont très abondantes au niveau du hile (**H**), alors qu'on en observe très peu dans le *stratum radiatum* de CA1 (Têtes de flèches pleines, **I**). Enfin, dans le hile des rats 3j/PiloSE, les cellules CD11b positives sont compactées et présentent des corps cellulaires gonflés et de courtes ramifications (**K**), alors qu'au niveau du *stratum radiatum* de CA1, elles sont moins denses et les cellules les plus fortement marquées ont une forme allongée (**L**). Le nombre de cellules CD11b positives de forme ronde par mm² est représenté pour la région du GD (couche moléculaire + couche granulaire + hile) en fonction des différents groupes (TN, n=4; 8h/PiloSE, n=3; 1j/PiloSE, n=6; 3j/PiloSE, n=3) (**M**). Test statistique ANOVA I suivie d'un test de Fisher LSD : ***, $p<0,001$ en comparaison des rats TN. Barres de mesure: A, 200 µm; B, 50 µm; C, 50 µm.

Abréviations : TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; GD, gyrus denté; CA1sr, *stratum radiatum* de CA1.

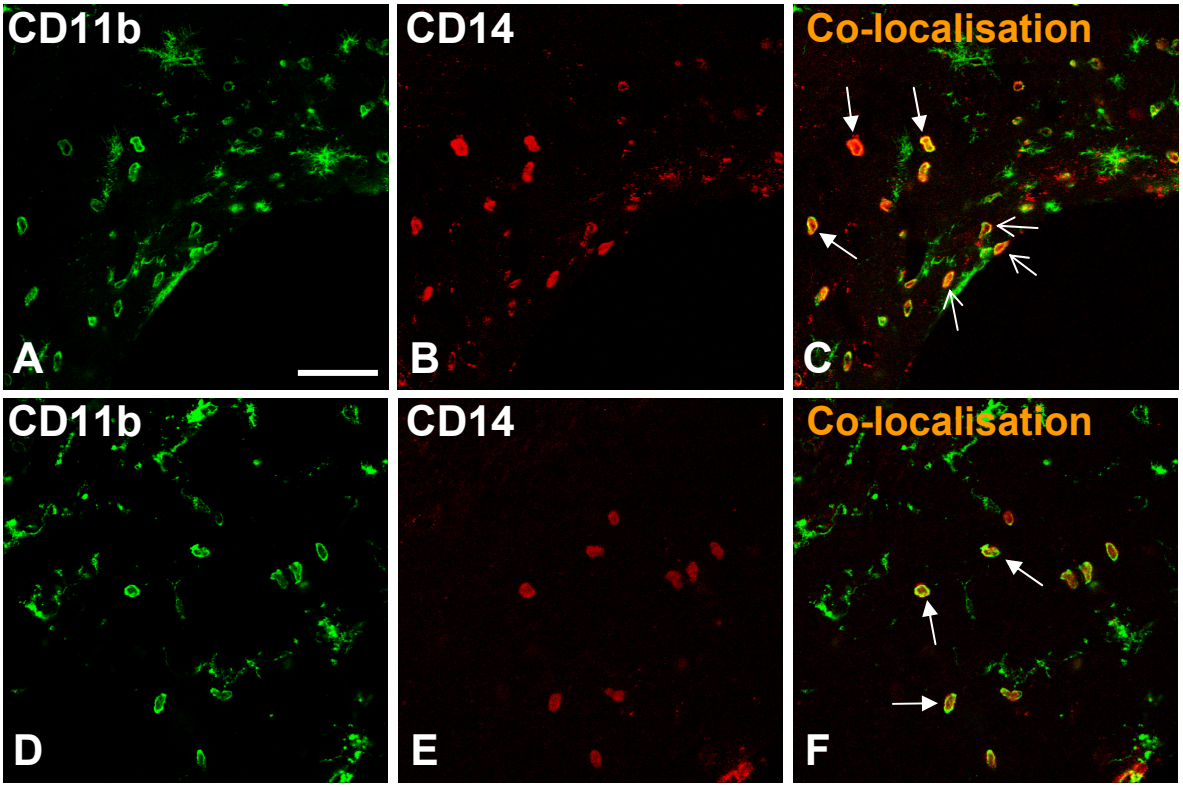


Figure R7 : Caractérisation « phénotypique » des cellules rondes CD11b-positives observées dans le hile 1 jour après *SE* induit par la pilocarpine

Cellules CD11b positives (CD11b, marqueur de cellules immunocompétentes) (**A** et **D**) et CD14 positives (CD14, marqueur de monocytes) (**B** et **E**) dans les régions de la couche moléculaire du GD, proche des leptoméninges (**A** à **C**), et dans le hile (**D** à **F**) de l'hippocampe de rats 1j/PiloSE. Ces cellules rondes CD11b positives observées dans le parenchyme cérébral sont également CD14 positives (Têtes de flèches pleines, **C** et **F**). Par ailleurs, la bordure leptoméningéale de la couche moléculaire externe du GD contient des cellules rondes CD11b positives qui sont également CD14 positives (Têtes de flèches vides, **C**). Barre de mesure: A, 50 µm.
Abréviations : TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine, GD, gyrus denté.

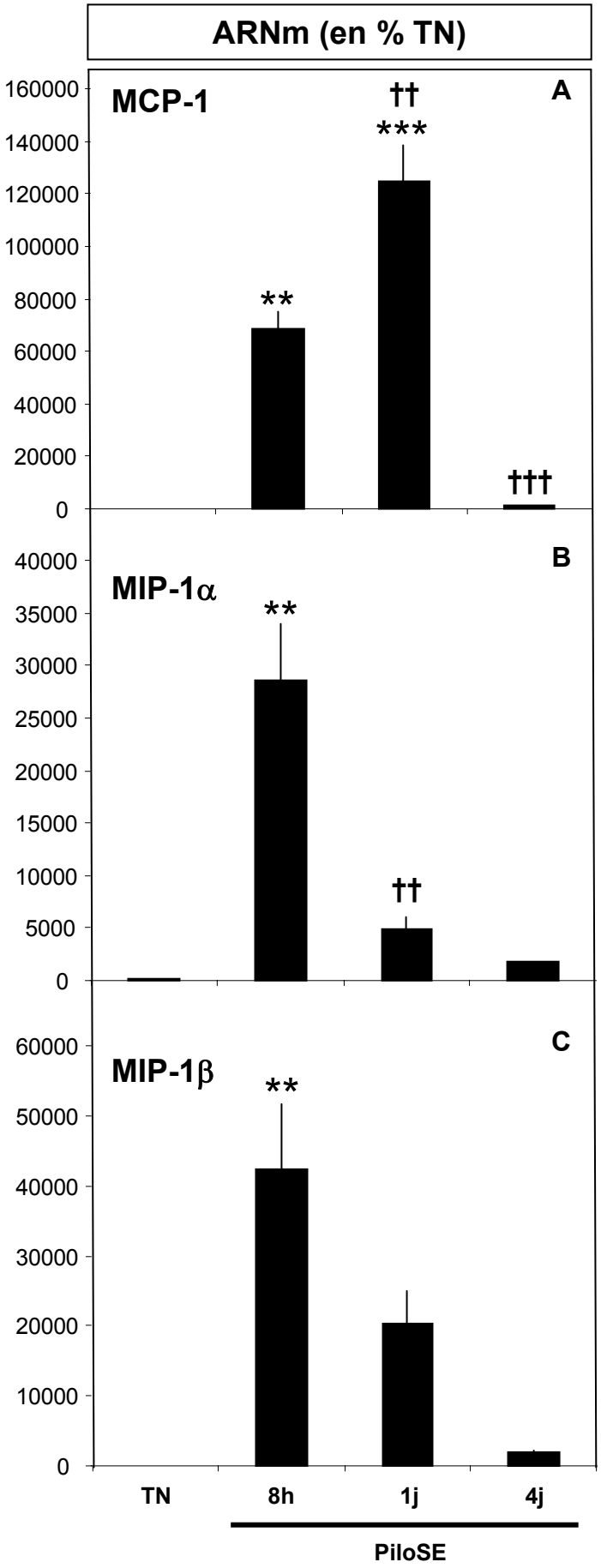


Figure R8 : Taux des ARNm des chimiokines MCP-1, MIP-1α et MIP-1β dans l'hippocampe à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine

Quantités des ARNm de MCP-1 (**A**), MIP-1α (**B**) et MIP-1β (**C**) dans l'hippocampe de rat à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine aux temps 8h (n=5), 1 jour (n=4), 4 jours (n=4). Le nombre de copies d'ADNc est obtenu par quantification à l'aide de la méthode de RT étalonnée et PCR en temps réel (voir *Matériels et méthodes*). Pour chaque ARNm d'intérêt, les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport à la valeur moyenne du nombre de copies d'ADNc détectées dans l'hippocampe des rats témoins naïfs (TN) (n=5) (pour MCP-1: 236 815 ± 18 631 copies/µg d'ARN totaux; pour MIP-1α : 70 990 ± 8424 copies/µg d'ARN totaux; pour MIP-1β : 4477 ± 601 copies/µg d'ARN totaux). Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: **, $p<0,01$, ***, $p<0,001$ en comparaison des rats TN; **††**, $p<0,01$, **†††**, $p<0,001$ par rapport au point précédent.

<u>*Abréviations*</u> : TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; MCP-1, protéine chimiotactique pour les monocytes; MIP-1α, protéine inflammatoire des macrophages alpha; MIP-1β, protéine inflammatoire des macrophages béta.

I.C.4. Synthèse et éléments de discussion

Ce travail démontre que des monocytes/ macrophages infiltrant le parenchyme cérébral participent à la réactivité de la microglie dès les phases les plus précoces de l'épileptogenèse. En effet, la détection de l'antigène CD11b, qui nous a permis de mettre en évidence une activation de la microglie résidente dès 8 h après *SE*, nous a également révélé l'existence d'une multitude de cellules « rondes », dont nous montrons ici qu'elles présentent à 93% le marqueur CD14, spécifique des monocytes circulants et macrophages des leptoméninges. La cinétique d'augmentation des taux d'ARNm des chimiokines MCP-1, MIP-1α et MIP-1β, qui exercent un chimiotactisme important vis-à-vis des cellules de la lignée monocytaire, est en faveur de l'hypothèse selon laquelle les cellules immunocompétentes périphériques auraient été attirées dans l'hippocampe par un chimiotactisme positif.

De nombreux monocytes/macrophages infiltrent transitoirement le parenchyme de l'hippocampe à la suite du *SE* : Une étude très récente a noté la présence de cellules « amiboïdes » dans la microglie de 1 à 7 jours après *SE* induit par la pilocarpine [136]. Toutefois, cette étude ne présente aucune donnée quantitative sur le nombre de ces cellules au cours de l'épileptogenèse, et ne montre aucune cellule CD11b avec la forme ronde caractéristique dévoilée dans notre travail à l'aide de l'anticorps anti-CD11b. Dans le but d'étayer notre hypothèse selon laquelle les cellules rondes CD11b positives correspondent à des cellules invasives de type monocyte/macrophage et non à des cellules microgliales résidentes, nous avons caractérisé par immunofluorescence réalisée sur des coupes cérébrales la distribution de CD14. Cette protéine correspond au récepteur des lipopolysaccharides (LPS) (un composant essentiel de la membrane externe de nombreuses bactéries) et est présente à la surface des cellules myéloïdes. Nos résultats expérimentaux confirment des études précédentes réalisées sur le tissu *post mortem* humain ou chez les rongeurs qui démontraient que le parenchyme du cerveau était dépourvu de cellules CD14 positives [25,26,40,149,237]. L'analyse par cytométrie de flux des cellules du cerveau confirme que les cellules microgliales résidentes sont caractérisées par la présence du marqueur CD11b alors que CD45 est en faible quantité ($CD45^{faible}$) et CD14 abscent [58]. Toutefois dans le cerveau, une petite quantité de cellules présentent les mêmes caractéristiques que les monocytes circulants ($CD11b+/CD45^{fort}/CD14+$) ; il s'agit des cellules périvasculaires [58]. *In situ*, nous n'avons détecté aucune cellule périvasculaire CD14 positive dans l'hippocampe de trois rats témoins différents. Il a été précédemment décrit qu'à l'état basal, les cellules périvasculaires sont préférentiellement regroupées dans les zones du cerveau caractérisées par une plus

grande perméabilité de la BHE telles que les plexus choroïdes [25,149] Ceci suggère que les espaces périvasculaires de l'hippocampe contiennent peu de cellules périvasculaires à l'état basal. Par ailleurs, dans les conditions physiologiques, nous n'avons observé qu'une petite quantité de cellules CD14 positives dans les leptoméninges. En revanche, un jour après *SE* induit par la pilocarpine, nous avons détecté pour la première fois de nombreuses cellules CD14 positives aussi bien dans les leptoméninges et les zones riches en vaisseaux sanguins (*SLMo* par exemple) que dans le parenchyme de l'hippocampe avoisinant, c'est-à-dire, le GD qui est encadré par la fissure hippocampique sur sa bordure dorsale et par les leptoméninges sur sa bordure ventrale. Par ailleurs, nous avons montré que 93% des cellules rondes CD11b positives retrouvées dans le parenchyme de l'hippocampe 1 jour après *SE* étaient également détectées CD14 positives. Enfin, nous n'avons plus observé de marquage CD14 dans l'hippocampe dès 4 jours après *SE*. Ces résultats confirment que des monocytes/macrophages infiltrent le parenchyme de l'hippocampe à partir des leptoméninges et des espaces péri-vasculaires à la suite du *SE* induit par la pilocarpine. L'ARNm de CD14 a été détecté dans les cellules du cerveau des rongeurs à la suite d'une injection intra-cérébrale de TNF-α [184], ou d'une injection systémique de LPS [149,183] ou encore d'une injection dans le cerveau de bactéries [40]. Il est établi que ces conditions provoquent une infiltration de leucocytes. L'augmentation du nombre de cellules CD14 positives est d'abord circonscrite aux zones où la BHE est plus perméable (comme les plexus choroïdes) et des leptoméninges, puis s'étend au parenchyme avoisinant. En outre, chez l'homme, des cellules rondes CD14 positives sont détectées dans le parenchyme péri-lésionnel du cerveau provenant de patients victimes de traumatisme crânien [25], d'ischémie cérébral [26], ou de sclérose en plaque [315].

Nous sommes les premiers à démontrer par une approche intégrée que la présence de cellules microgliales « amiboïdes » dans le parenchyme de l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine résulte d'une infiltration massive de monocytes/macrophages. Ceci est en contradiction avec une étude précédente réalisée sur la souris sauvage irradiée et transplantée par de cellules GFP positives. [170](voir paragraphe II.A.1.b. de l'historique scientifique). Aucune variation du contingent de cellules immunocompétentes GFP positives n'est observée à la suite du *SE* induit par l'acide kaïnique. Toutefois, les irradiations en elles-mêmes modifient le comportement des cellules microgliales résidentes et provoquent une infiltration de monocytes/macrophages [179]. Dans ces conditions, il n'est peut être plus nécessaire pour le parenchyme de recruter de nouveaux monocytes/macrophages à la suite de *SE*.

La synthèse de chimiokines précède l'infiltration par les monocytes/macrophages : Il a été précédemment montré que les chimiokines MCP-1, MIP-1α et MIP-1β jouaient un rôle

essentiel dans l'infiltration de leucocytes dans l'hippocampe à la suite de la section des axones qui connecte aux neurones granulaires du cortex [11]. En effet, 1) les ARNm de ces trois chimiokines sont en quantité augmentée dans l'hippocampe dans une fenêtre de temps qui précède l'infiltration des leucocytes, 2) le transcrit de la chimiokine MCP-1, en particulier, est synthetisé par les astrocytes réactifs et des cellules amiboïdes de la microglie dans les sites de lésion, et enfin 3) l'infiltration des leucocytes est fortement attenuée chez les souris dont le gène du récepteur à haute affinité de MCP-1 (CCR2) est invalidé, et modérément atténuée chez les souris dont le gène du récepteur de haute affinité de MIP-1α et MIP-1β (CCR5) est invalidé [11]. Nous sommes les premiers à montrer, dans l'hippocampe de rat soumis à une épileptogenèse expérimentale, une très forte augmentation de la quantité des ARNm de MCP-1, MIP-1α et MIP-1β dans une fenêtre de temps qui précède la présence de cellules rondes CD11b/CD14 positives. Lorsque MCP-1 est injecté dans le cerveau, il provoque un recrutement des monocytes/macrophages [21]. Les monocytes/macrophages recrutés s'accumulent alors en premier lieu au site d'injection, et à la fissure de l'hippocampe (zone très proche du *SLMo*) et des leptoméninges [21]. Il est possible que les cellules de la microglie précocément activées, mais aussi les astrocytes réactifs, soient le lieu de synthèse des chimiokines et, en particulier, de MCP-1, comme cela a été déjà observé dans les cas d'encéphalomyélite acquise expérimentale [294] ou d'axotomie des voies afférentes au GD [11]. Ainsi, à la suite du SE, l'induction précoce et considérable de la synthèse des chimiokines MCP-1, MIP-1α et MIP-1β engendrerait le recrutement des monocytes/macrophages, soit à partir du compartiment vasculaire, soit à partir des leptoméninges.

L'induction de la production des chimiokines : une signature moléculaire imparfaite de l'infiltration monocytaire ? : Il a été très récemment montré que la quantité de MCP-1 est fortement augmentée dans l'hippocampe un jour après administration d'acide kaïnique (1 nmol) dans cette structure. Cette induction est accompagnée de l'activation de la chimiokine, qui dépend de l'activité protéolytique de la plasmine [262]. Dans ce système expérimental, très peu de cellules « rondes » sont détectées dans les phases précoces suivant l'injection d'acide kaïnique [302]. L'induction de la production de MCP-1 serait dans ce cas indispensable au recrutement et déplacement des cellules « résidentes » de la microglie [262]. Bien qu'il ait été montré qu'un apport exogène de MCP-1 conduise a une recrutement de monocytes/macrophages [21], la détection de l'induction de sa synthèse dans le cerveau n'est pas suffisante pour conclure à l'infiltration de leucocytes. Il apparaît donc indispensable de rechercher la présence tissulaire de marqueurs des monocytes/marcophages, tels que CD14.

II. Induction de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, TNF-α et IL-6 dans l'hippocampe à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine

Cette étude est la première à mettre en évidence dans le cerveau de rats soumis à une epileptogénèse expérimentale, la présence d'acteurs périphériques de l'inflammation (monocytes et macrophages), qui est concomitante, dans le hile, à la mise en place de processus de neurodégénérescence. Il se pourrait que ces cellules libérent des facteurs toxiques pour les neurones. Des études précédentes ont caractérisé l'activation d'autres acteurs de l'inflammation à la suite d'un *SE*, soit induit par l'acide kaïnique [302], soit par stimulation électrique rapide de l'hippocampe ventral [55]. Ces acteurs sont notamment les cytokines pro-inflammatoires IL-1β, TNF-α et IL-6, dont certaines présentent des effets délètères pour les neurones dans d'autres circonstances (voir paragraphe II.B.3 de l'historique scientifique). Nous avons donc quantifié dans l'hippocampe à la suite du *SE* induit par la pilocarpine les ARNm de ces protéines par RT étalonnée et PCR en temps réel. Nous avons ensuite recherché la distribution tissulaire de ces protéines par les techniques immunohistochimiques.

II.A. LES CYTOKINES IL-1β ET IL-1 RA ET LE RECEPTEUR IL-1 DE TYPE I

Grâce à la technique RT-PCR étalonnée en temps réel, nous avons mesuré les quantités d'ARNm de l'IL-1β, de l'IL-1 Ra et de l'IL-1 RI dans les hippocampes de rats témoins naïfs (TN), et de rats ayant développé un *SE* induit par la pilocarpine 3 h (3 h/ PiloSE), 8 h (8 h/ PiloSE), 1 jour (1 j/ PiloSE), 2 jours (2 j/ PiloSE), 3 jours (3 j/ PiloSE) et 7 jours (7 j/ PiloSE) auparavant. Le *SE* induit par la pilocarpine entraîne une augmentation transitoire de la quantité des ARNm de ces protéines dans l'hippocampe (***Figures R9A, R9B, R9C***). Le pic apparent se situe à 8 h après l'induction du *SE* pour l'IL-1β (~x 53); la quantité d'ARNm reste élevée 1 jour après *SE* (~x 12) et retourne à son taux de base 2 jours après *SE* (***Figure R9A***). La quantité d'ARNm de l'IL-1 Ra augmente plus tard que celle des ARNm de l'IL-1β, puisque le pic apparent se situe 1 jour après induction du *SE* (+ 928%) ; le retour au niveau de base est observé 2 jours après *SE* (***Figure R9B***). L'augmentation de la quantité des ARNm de l'IL-1 RI est détectée dès 1 jour après la mise en place du *SE* (~x 2,8) ; le pic apparent se situe à 2 jours après *SE* (~x 4,6) et le retour au niveau de base est observé 7 jours après l'induction du *SE* (***Figure R9C***).

Le dosage par ELISA des cytokines IL-1β et IL-1 Ra révèle que les concentrations de ces deux cytokines augmentent dans l'hippocampe dès 1 jour après l'induction du *SE* (***Figures R9D, R9E***), ce qui signifie que l'augmentation de la quantité des ARNm est suivie de celle des protéines correspondantes.

L'analyse immunohistochimique de l'IL-1β dans l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine révèle dans le hile, la présence d'un signal intense détecté dès 8 h après du *SE* (***Figure R9G***), alors qu'aucun signal n'est observé dans le hile ni chez les témoins naïfs (***Figure R9F***) ni chez les rats 3 h/ PiloSE (d*onnée non illustrée*). Les cellules du hile qui produisent fortement cette cytokine ont une morphologie de cellules de la microglie en cours d'activation avec des corps cellulaires hypertrophiés et des prolongements raccourcis (*Flèche noire,* ***Figure R9G***). Des cellules rondes produisent également cette cytokine dans le hile, en particulier chez les rats 1 j/ PiloSE (*Têtes de flèches pleines,* ***Figure R9H***). En revanche, 3 jours après la mise en place du *SE*, l'IL-1β n'est plus détectable dans le hile (*donnée non illustrée*).

Seulement quelques neurones (NeuN positifs) contiennent l'IL-1β dans le cerveau de rats TN (*donnée non illustrée*). En revanche, 1 jour après *SE*, l'IL-1β est essentiellement contenue dans les cellules microgliales amiboïdes (cellules infiltrantes) et très peu dans les cellules ramifiées de cette même microglie (***Figures R9I, R9J, R9K***). Quelques astrocytes (GFAP positifs) contiennent aussi cette cytokine dans l'hippocampe 1 jour après l'induction du *SE*, en particulier dans le *stratum radiatum* de CA1 (*donnée non illustrée*).

II.B. LES CYTOKINES TNF-α ET IL-6

Nous avons mesuré par RT-PCR étalonnée en temps réel les quantités d'ARNm du TNF-α, de l'IL-6 dans l'hippocampe de TN, et de rats 8 h/ PiloSE, 1 j/ PiloSE, 2 j/ PiloSE, 3 j/ PiloSE et 7 j/ PiloSE. Nous avons observé une augmentation transitoire des taux d'ARNm du TNF-α (***Figure R10A***) et de l'IL-6 (***Figure R10B***). Cette augmentation des ARNm du TNF-α est bimodale : un premier pic apparent est observé 8 h après *SE* (~x 18), et un second pic plus modeste est mis en évidence 3 j après *SE* (~x 3,9) (***Figure R10A***). Après le premier pic, la quantité d'ARNm du TNF-α est encore significativement élevée 1 j après *SE* (~x 5,3) (***Figure R10A***). En revanche, un seul pic est observé pour l'ARNm de l'IL-6 à 8 h après *SE* (~x 279) ; la quantité d'ARNm reste élevée 1 jour après *SE* (~x 42) et retourne au niveau de base 2 jours après *SE* (***Figure R10B***).

Le TNF-α et l'IL-6 ont été détectées par immunohistochimie dans l'hippocampe de rats TN, et de rats 1 j/ PiloSE. Dans les deux cas, quelques cellules apparaissent faiblement marquées dans le hile dans les conditions de base (***Figures R10C, R10E***). En particulier dans le hile, les cellules IL-6 positives présentent une morphologie caractéristique de certains interneurones (forme bipolaire) (*Tête de flèche pleine,* ***Figure R10E***), ce qui suggère alors un rôle neuromodulateur de cette cytokine dans les conditions physiologiques. De nombreuses cellules de type amiboïdes sont détectées TNF-α positives 1 j après *SE*, principalement localisées dans la couche moléculaire du GD (*Têtes de flèche vide,* ***Figure R10D***). Des cellules de type amiboïde apparaissent immunoréactives à l'IL-6 dans le hile 1 j après *SE*, et sont particulièrement abondantes dans la zone sous-granulaire (***Figure R10F***).

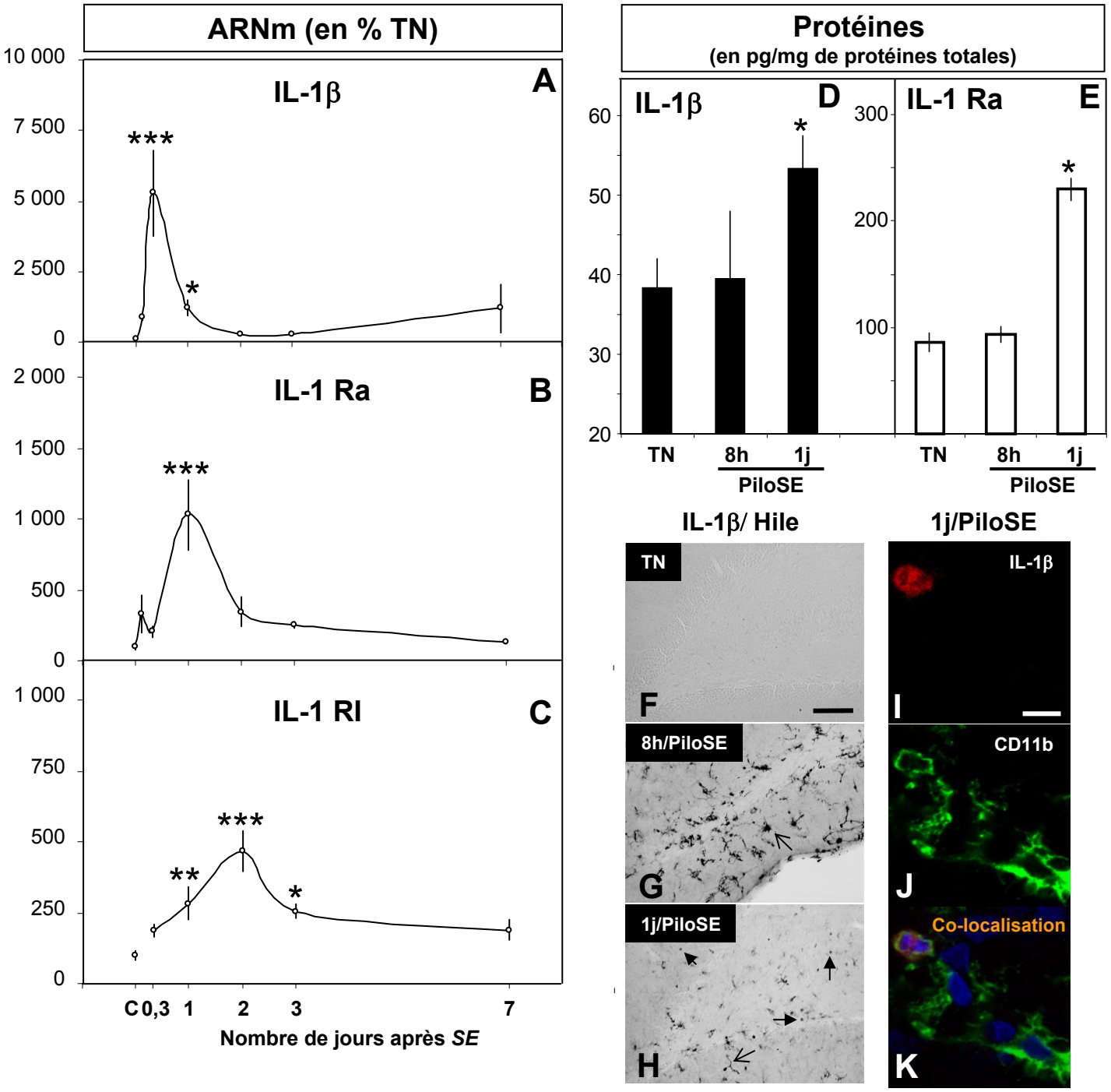


Figure R9 : Taux des ARNm et des protéines du système de l'IL-1 et répartition des protéines dans l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine

(légende voir page suivante)

Figure R9 : Taux des ARNm et des protéines du système de l'IL-1 et répartition des protéines dans l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine

Taux des ARNm de l'IL-1β (**A**), de l'IL-1 Ra (**B**) et de l'IL-1 RI (**C**) aux temps 3h (n=3) (*sauf pour l'IL-1 RI*), 8h (0,3 jour) (n=5), 1 jour (n=6), 2 jours (n=6), 3 jours (n=8) et 7 jours (n=3) dans l'hippocampe de rat à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine. Le nombre de copies d'ADNc est déterminé par la méthode de RT-PCR étalonnée en temps réel (voir *Matériels et méthodes*). Pour chaque ARNm d'intérêt, les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport à la valeur moyenne du nombre de copies déterminée dans l'hippocampe des rats témoins (notés C) qui sont des rats TN (n=5) (pour l'IL-1β: 2388 ± 206 copies/ µg d'ARN totaux; pour l'IL-1 Ra: 53 517 ± 12 786 copies/µg d'ARN totaux; pour l'IL-1 RI: 2744 ± 1446 copies/µg d'ARN totaux).Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: *, p<0,05; **, p<0,01, ***, p<0,001 par comparaison avec les rats TN. La quantité tissulaire des protéines IL-1β (**D**) et IL-1 Ra (**E**) est représentée dans l'hippocampe de rats TN et de rats 8h/PiloSE et 1j/PiloSE. Les quantités de protéines sont mesurées par les trousses de réactifs ELISA spécifiques (voir *Matériels et méthodes*), et les résultats sont exprimés en pg de cytokines par mg de protéines totales extraites. Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: *, p<0,05; par comparaison avec les rats TN. Cellules IL-1β-positives du hile de rat TN (**F**) et de rats 8h/PiloSE (**G**) et 1j/PiloSE (**H**). De nombreuses cellules présentent des corps cellulaires gonflés et des prolongements courts dans le hile 8h après *SE* (Têtes de flèches vides, **G**), alors qu'1j après *SE*, certaines cellules IL-1β-positives ont une forme ronde (Têtes de flèches pleines, **H**) et que d'autres présentent quelques prolongements (Tête de flèche vide, **H**). Le double marquage fluorescent révèle que la majorité des cellules IL-1β-positives (**I**, rouge) sont des cellules de la microglie (**J**, CD11b marqueur de cellules microgliales, vert). Les noyaux sont marqués en bleu par le DAPI (**K**). Barres de mesure : F, 100 µm; I, 50 µm.

Abréviations : C, témoins; TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; IL-1β, interleukine-1 béta; IL-1 Ra, antagoniste du récepteur à l'interleukine-1; IL-1 RI, récepteur de l'interleukine-1 de type 1.

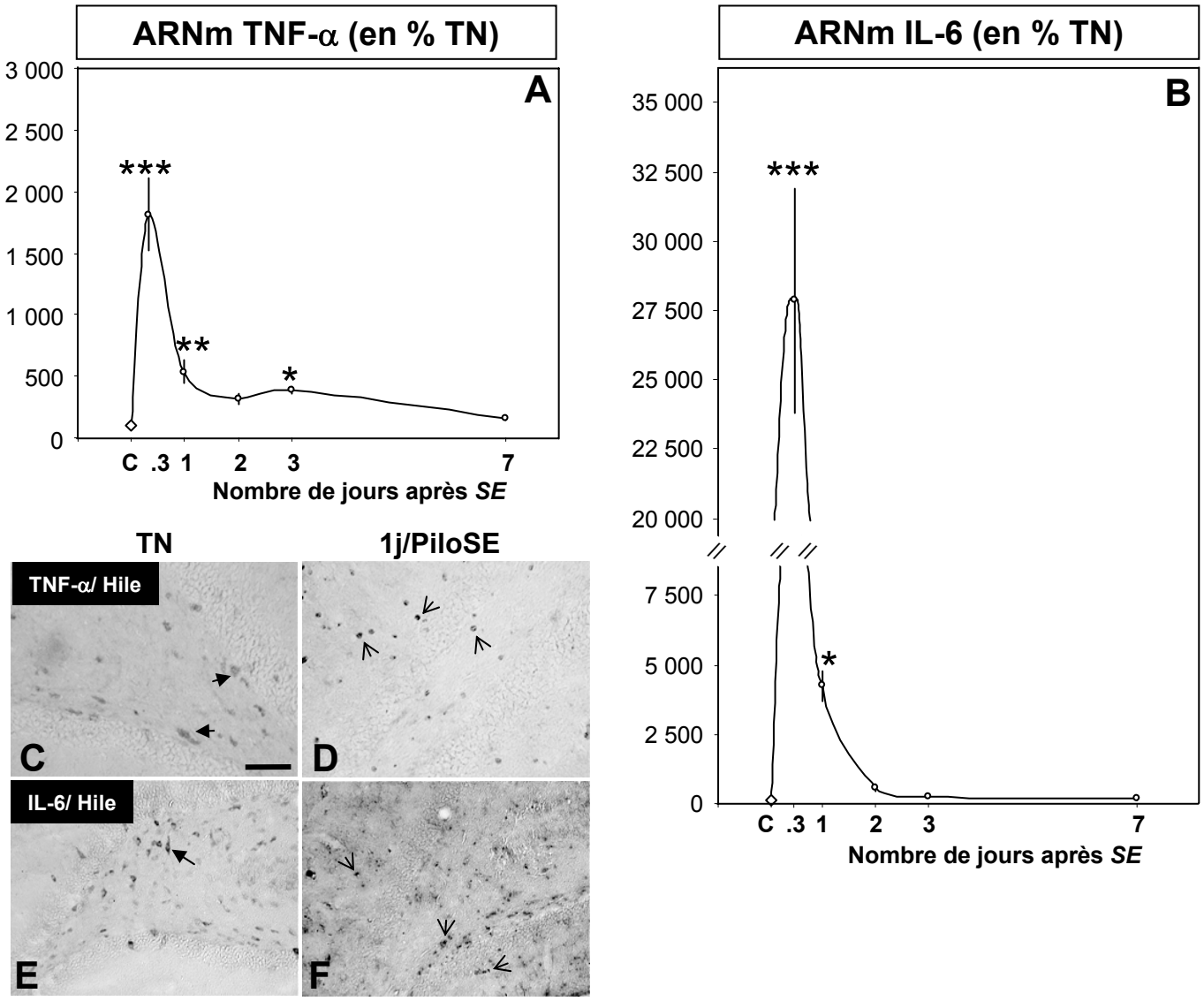


Figure R10 : Taux des ARNm des cytokines TNF-α et IL-6 et répartition des protéines dans l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine

Taux des ARNm de TNF-α (**A**) et l'IL-6 (**B**) aux temps 8h (0,3 jour) (n=5), 1 jour (n=6), 2 jours (n=6), 3 jours (n=8) et 7 jours (n=3) dans l'hippocampe de rat à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine. Le nombre de copies d'ADNc est déterminé par la méthode de RT-PCR étalonnée en temps réel (voir *Matériels et méthodes*). Pour chaque ARNm d'intérêt, les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport à la valeur moyenne du nombre de copies déterminée dans l'hippocampe des rats témoins (notés C) qui sont des rats TN (n=5) (pour le TNF-α : 14 487 ± 1072 copies/ µg d'ARN totaux et pour l'IL-6: 152 ± 22 copies/µg d'ARN totaux). Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: *, $p<0,05$; **, $p<0,01$, ***, $p<0,001$ par comparaison avec les rats TN. Cellules TNF-α-positives (**C** et **D**) et cellules IL-6 positives (**E** et **F**) du hile de rat TN (**C** et **E**) et de rat 1j/PiloSE (**D** et **F**). La distribution tissulaire de ces deux cytokines est sensiblement similaire, puisque quelques cellules apparaissent faiblement marquées dans le hile des rats TN (Têtes de flèches pleines, **C** et **E**) alors que de nombreuses cellules rondes apparaissent fortement marquées dans le hile des rats 1j PiloSE (Têtes de flèches vides, **D** et **F**). Barre de mesure : C, 100 µm.
Abréviations : C, contrôles; TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; TNF-α, facteur de nécrose tumorale alpha; IL-6, interleukine-6

II.C. SYNTHESE ET ELEMENTS DE DISCUSSION

Similitudes et différences présentées par les cytokines dans les différents modes d'induction du SE : analyse de la réponse gliale

Taux et profils d'induction : Conformément à une étude précédente réalisée chez le rat dont le *SE* a été induit par stimulation électrique de l'hippocampe ventral [55], nos résultats montrent une augmentation rapide et synchronisée après *SE* induit par la pilocarpine du taux des ARNm de l'IL-1β, du TNF-α et de l'IL-6, et une augmentation retardée du taux d'ARNm de l'IL-1 Ra. En revanche, nos résultats présentent principalement deux différences avec cette étude (précédemment citée) : 1) nous avons décelé une augmentation considérable des taux des ARNm de l'IL-1β (environ x 52), du TNF-α (environ x 18) et de l'IL-6 (environ x 279) par rapport à celle initialement décrite : environ x 4 pour l'IL-1β, x 2 pour le TNF-α et x 5 pour l'IL-6 [55]; 2) le taux de base de l'ARNm de l'IL-1β est retrouvé dès 2 jours après *SE* induit par la pilocarpine, alors qu'il n'est toujours pas observé 60 jours après *SE* lorsque celui-ci a été induit par stimulation électrique de l'hippocampe ventral [55]. Ces différences peuvent en partie s'expliquer par le fait que notre technique de dosage des ARNm est plus sensible (RT-PCR étalonnée en temps réel au lieu de RT-PCR conventionnelle et étalonnage par un gène de ménage) et s'affranchit de l'utilisation d'un gène de ménage pour étalonner la réaction de transcription inverse, ce qui peut parfois introduire un biais expérimental dans la détermination de la quantité d'ARNm. Le taux d'ARNm dans le tissu correspond à un état d'équilibre dynamique entre la synthèse de cet ARNm et sa dégradation. Une augmentation de ce taux peut s'expliquer par exemple par une augmentation de la synthèse de l'ARNm ou par une diminution de sa dégradation (augmentation de sa stabilisation). Au regard de l'ampleur de l'augmentation des taux d'ARNm des cytokines pro-inflammatoires retrouvée dans notre étude, il est fort probable que cela implique une activation importante de la transcription de leurs gènes.

Identité des cellules qui produisent les cytokines à la suite du *SE* : L'augmentation du taux d'ARNm de l'IL-1β est suivie dans notre étude d'une augmentation de la synthèse protéique. Cette cytokine est détectée dans un premier temps dans les cellules microgliales activées, puis dans les cellules de type monocytes/macrophages. Par ailleurs, les cellules amiboïdes, présentes dans le tissu un jour après *SE*, sont non seulement la source majoritaire à ce temps d'IL-1β, mais aussi celle de TNF-α et d'IL-6. Toutefois, quand aucun ou très peu de monocytes infiltrent le parenchyme cérébral, à la réponse microgliale précoce consistant en

l'induction d'IL-1β, suivrait la réponse des astrocytes, qui deviennent alors le lieu de synthèse majoritaire d'IL-1β, de TNF-α et d'IL-6 [55].

Les cytokines pro-inflammatoires et la neurodégénérescence

Induction de la production neuronale des récepteurs des cytokines : une réponse suicidaire ? : Nos résultats expérimentaux indiquent que l'augmentation des taux des ARNm des cytokines pro-inflammatoires mesurée après *SE* précède dans l'hippocampe la mise en place de la neurodégénérescence. En outre, ces cytokines sont essentiellement produites 1 jour après *SE* par les cellules infiltrantes dans le hile, au moment même où l'on y détecte des neurones dégénérescents. La forte présence d'IL-1β contribuerait à la dégénérescence des neurones. En effet, les neurones de l'hippocampe sont résistants au *SE* lorsque celui-ci est induit par la bicuculline et cette résistance étonnante est associée à la faible présence dans le tissu de cellules qui produisent de l'IL-1β [302]. C'est la liaison de l'IL-1β à son récepteur IL-1RI présent à la surface des neurones de l'hippocampe qui entraînerait leur vulnérabilité à la suite du *SE* induit par la pilocarpine. A l'état basal, les neurones pyramidaux de CA1 et CA3 principalement produisent en faible quantité ce récepteur [232], alors qu'à la suite d'un *SE*, sa production augmente rapidement non seulement dans les neurones pyramidaux précédemment cités, mais aussi dans les neurones du hile [232]. Ensuite, les astrocytes réactifs du *SLMo* et des *stratums radiatum* de CA1 et de CA3 synthétisent également l'IL-1RI à la suite du *SE* [232]. Nous avons détecté pour la première fois une augmentation du taux de l'ARNm de l'IL-1RI dans l'hippocampe de rat après *SE* induit par la pilocarpine. Cette augmentation est décelée dès 1 jour après *SE*, présente un pic apparent situé 2 jours après *SE* et est maintenu jusqu'au 3ième jour après *SE*. Il est possible que les neurones pyramidaux de CA1 et de CA3 ainsi que les neurones du hile soient responsables, dans un premier temps, de cette induction [232]. La vulnérabilité des neurones qui produisent l'IL-1RI en présence d'une importante quantité tissulaire de l'IL-1β pourrait s'expliquer par l'activation d'une voie de signalisation qui provoque la phosphorylation de la sous-unité NR2B du récepteur NMDA [301]. Ce mécanisme augmente l'influx de calcium dans le neurone et l'excitotoxicité glutamatergique [301].

Pour pallier la toxicité de l'IL-1β, le tissu endommagé répond par l'induction de la production d'IL-1 Ra, antagoniste naturel du récepteur à l'IL-1 RI. Cette cytokine anti-inflammatoire, dont les injections multiples par voie i.c.v. protégent les neurones pyramidaux de CA1 et de CA3 après injections d'acide kaïnique [207]. L'induction de sa production dans l'hippocampe à la suite du *SE* serait malheureusement trop tardive pour contrecarrer les effets délétères de l'IL-1β.

Exacerbation de la toxicité de l'IL-1β par la présence de TNF-α : La cytokine TNF-α exacerbe la mort des neurones chez les rats soumis à une ischémie expérimentale [14,316]. Nous montrons que cette cytokine est essentiellement contenue dans des cellules immunocompétentes de forme ronde 1 jour après *SE*. En culture, cette cytokine potentialise les effets neurotoxiques de IL-1β [43]. Il se pourrait alors que l'apport dans le tissu de TNF-α par les cellules infiltrantes (cellules rondes) contribue à la mise en place de la neurodégénérescence. Le TNF-α pourrait, comme en culture, augmenter la libération de glutamate par les astrocytes [301].

Les augmentations synchrones des taux des ARNm d'IL-1β et de TNF-α dans l'hippocampe ne constituent pas pour autant une signature moléculaire de la neurodégénérescence. En effet, après « kindling » de l'amygdale, les taux des ARNm de ces deux cytokines sont fortement augmentés dans l'hippocampe alors que les processus neurodégénératifs sont minimes. Ce mode expérimental d'installation progressive de l'hyperexcitabilité ne provoquerait aucune infiltration de monocytes/macrophages dans l'hippocampe. La production du TNF-α et de l'IL-1β par les cellules neurales (neurones, astrocytes ou microglie résidente) ne serait donc pas un élément de toxicité suffisant. En revanche, la sur-production de ces cytokines par des cellules infiltrant le parenchyme cérébral (monocytes/macrophages) serait, associé à d'autres éléments délétères dans l'environnement des neurones, hautement toxique pour les neurones.

Toxicité de l'IL-6 ? : L'invalidation du gène de l'IL-6 chez des souris provoque une augmentation non seulement de la mortalité mais aussi de la mort des neurones après *SE* induit par l'acide kaïnique [215], ce qui suggère un rôle neuroprotecteur de l'IL-6 endogène. En revanche, les neurones du hile (interneurones GABA-ergiques et les cellules moussues) sont plus vulnérables à l'administration d'acide kaïnique à des doses sous-convulsivantes chez les souris transgéniques qui sur-expriment le gène de l'IL-6 dans leurs astrocytes [245]. L'utilisation de souris transgéniques ne permet donc pas de mettre clairement en évidence un rôle neurotoxique de l'IL-6. Le rôle de cette cytokine sur les modifications de l'hippocampe à la suite du *SE* reste à définir.

Au regard de l'ensemble de ces résultats, l'inflammation de l'hippocampe, caractérisée par une réponse des cellules microgliales résidentes, par une infiltration massive de monocytes/ macrophages et par une forte production locale de cytokines pro-inflammatoires joueraient un rôle essentiel dans la transformation épileptique de cette région du cerveau.

III. Effets des anti-inflammatoires sur la gliose réactionnelle et la mort des neurones observée dans l'hippocampe de rat à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine

L'administration de doses élevées de glucocorticoïdes est actuellement pratiquée lors de la prise en charge des patients en unités de soins intensifs neurologiques [95]. Bien que les glucocorticoïdes présentent, à forte dose, certains effets bénéfiques, comme la réduction de l'œdème cérébral [32,191], c'est surtout à cause de leurs effets bénéfiques sur le contrôle de la réponse immunitaire périphérique sur le long terme qu'ils ont été utilisés pour tenter de « contenir » l'inflammation du cerveau. Toutefois, en fonction de la région concernée du cerveau, le traitement chronique aux glucocorticoïdes peut n'exercer aucune activité anti-inflammatoire ou, au contraire, exacerber certains aspects de la réponse inflammatoire [272]. Notamment, des taux importants de glucocorticoïdes potentialisent l'activation de la microglie et l'infiltration de granulocytes, de même que la dégénérescence des neurones, à la suite de l'administration intra-hippocampique d'acide kaïnique [60]. D'autres anti-inflammatoires, non stéroïdiens (AINS), ont été testés. En particulier, l'indométhacine s'est révélée efficace pour réduire dans l'hippocampe, l'activation de la microglie provoquée par le traitement au LPS [179]. Aucune étude n'avait jusqu'alors recherché à savoir si ces deux classes d'anti-inflammatoires (glucocorticoïdes et indométhacine) pouvaient améliorer, d'une part la récupération globale des animaux à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine et, d'autre part, la résistance du cerveau (diminution de la sclérose de l'hippocampe, des pertes de neurones, de la gliose réactionnelle). Nous avons donc analysé les effets à long terme (15 jours après *SE*) de ces deux traitements administrés rapidement après le *SE* sur les lésions précédemment décrites dans l'hippocampe (voir partie I des résultats). Nous avons sélectionné le traitement qui montrait les effets les plus bénéfiques pour approfondir les mécanismes qui pourraient les sous-tendre.

III.A. EFFETS DES ANTI-INFLAMMATOIRES SUR LA RECUPERATION DES RATS A LA SUITE D'UN *STATUS EPILEPTICUS* INDUIT PAR LA PILOCARPINE

Au cours de la phase silencieuse du modèle pilocarpine (les 15 premiers jours), nous avons analysé le comportement de différents groupes de rats :

- les rats ayant développé un *SE* (PiloSE)
- les rats ayant développé un *SE* et ayant reçu le traitement à base d'indométhacine (PiloSE + Indo)
- les rats ayant développé un *SE* et ayant reçu le traitement à base de méthylprednisolone (PiloSE + MP)
- les rats ayant développé un *SE* et ayant reçu un traitement combiné à base d'indométhacine et de méthylprednisolone (PiloSE + Indo + MP).

Le détail des protocoles de traitement est décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. Brièvement, les deux traitements sont administrés à l'issue du *SE* ; l'indométhacine a été administrée par voie rectale à la dose de 10 mg/kg et ce traitement a, dans certains cas, été prolongé sur le long terme à des doses plus faible, alors que la méthylprednisolone a été administrée par voie i.p. à la dose de 20 mg/kg et cette injection a été répétée chaque jour pendant les deux premiers jours à la suite du *SE*.

Les différents traitements n'entraînent aucune amélioration de la survie des rats ayant développé un *SE* et tendraient au contraire à augmenter la mortalité (taux de survie : PiloSE, 83% ; PiloSE + Indo, 67% ; PiloSE + MP, 57% ; PiloSE + Indo + MP, 57%). Toutefois, l'état général des rats qui survivent est meilleur pour les rats qui ont reçu le traitement à l'indométhacine, avec un gain de masse plus rapide (***Figure R11***), sans que cela corresponde à une augmentation de leur prise alimentaire ou de leur consommation en eau par comparaison aux rats PiloSE (*données non illustrées*).

III.B. EFFETS DES ANTI-INFLAMMATOIRES SUR LES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES DE L'HIPPOCAMPE

Nous avons comparé l'effet des trois traitements (Indo, MP, Indo + MP) sur l'atrophie de l'hippocampe, la perte neuronale et la gliose réactionnelle.

III.B.1. L'atrophie de l'hippocampe

Nous avons mesuré la surface des hippocampes le long de l'axe rostro-caudal (IA :+6,44 mm à IA : +4,70 mm) des cerveaux de rats témoins naïfs (TN), et 15 jours après *SE* dans les différents groupes de rats :15 j/ PiloSE, 15 j/ PiloSE + Indo, 15 j/ PiloSE + MP, et enfin 15 j/ PiloSE + Indo + MP (***Figure R12***). Nos résultats montrent que seul le traitement à base d'indométhacine permet de prévenir le développement de l'atrophie au cours de l'épileptogenèse (***Figure R12***). Les rats 15 j/ PiloSE + Indo + MP présentent une légère atténuation de l'atrophie observée dans les cerveaux de rats 15 j/ PiloSE. Les traitements incluant la méthylprednisolone n'entraînent aucune amélioration de l'atrophie (***Figure R12***).

III.B.2. La perte des neurones

La perte de neurones estimée dans les régions CA1 et dans le hile 15 jours après *SE* n'est pas affectée par le traitement à base d'indométhacine (***Figure R13A***). En revanche, le traitement à base de méthylprednisolone exacerbe la perte des neurones dans les deux régions étudiées (CA1 : -42% au lieu de -21,5% chez les rats 15 j/ PiloSE ; hile : -59% au lieu de -43% chez les rats 15 j/ PiloSE) (***Figures R13A, R13F, R13G***). Par ailleurs, le traitement par l'indométhacine protège contre les effets délétères du traitement à base de méthylprednisolone uniquement les neurones de CA1, et non les cellules du hile (***Figure R13A***).

III.B.3. La réactivité de la microglie

Les rats ayant reçu un traitement anti-inflammatoire (indométhacine et/ou méthylprednisolone) présentent une densité de marquage CD11b qui n'est plus corrélée avec celle des cellules NeuN positives (comme démontré dans le paragraphe I.A.3 des résultats). Par exemple, alors que le traitement à base de méthylprednisolone exacerbe la perte des neurones de CA1 et du hile, il atténue la densité de marquage CD11b dans ces deux mêmes aires (***Figure R13H***). Cet effet est particulièrement marquant dans CA1 (***Figures R13F, R13M***), ce qui suggère que la méthylprednisolone puisse présenter des propriétés neurotoxiques. Par ailleurs, bien que le traitement à base d'indométhacine ne modifie pas l'ampleur de la perte des neurones 15 jours après *SE*, il diminue la densité de marquage CD11b du hile, ce qui indique que l'accumulation de cellules microgliales activées est moindre dans cette région vulnérable après traitement à l'indométhacine. La combinaison des deux traitements anti-inflammatoires n'altère pas la densité de marquage de CD11b ni dans CA1, ni dans le hile, malgré une perte neuronale exacerbée dans le hile (***Figures R13A, R13H***).

Compte tenu des effets négatifs de la méthylprednisolone sur la survie des rats au cours de l'épileptogenèse et de l'exacerbation observée de la perte des neurones de CA1 et du hile à la fin de la période de l'épileptogenèse, nous avons décidé de ne pas approfondir nos recherches sur les effets de cet anti-inflammatoire dans la phase précoce de l'épileptogenèse. En revanche, le traitement par l'indométhacine présente certains effets notables comme la prévention du développement de l'atrophie et une atténuation de l'accumulation de cellules microgliales activées dans le hile. Nous avons donc recherché si cette atténuation pouvait être due à une diminution de la microgliose réactionnelle dans la phase précoce de l'épileptogenèse.

III.C. EFFETS DE L'INDOMETHACINE SUR LA DYNAMIQUE DE LA GLIOSE REACTIONNELLE ET DE LA NEURODEGENERESCENCE A LA SUITE D'UN *STATUS EPILEPTICUS* INDUIT PAR LA PILOCARPINE

III.C.1. Effet sur la microgliose réactionnelle

Le traitement à l'indométhacine atténue la densité de marquage CD11b du hile 15jours après *SE*, sans toutefois affecter celle mesurée 1 jour et 3 jours après *SE* (***Figure R14D***). Ceci suggère que le traitement à l'indométhacine n'affecte pas la mise en place précoce de la microgliose réactionnelle dans l'hippocampe après *SE*. Par ailleurs, le nombre de cellules rondes CD11b positives observées transitoirement 1 jour après *SE* est diminué par le traitement à l'indométhacine (~ -40%) (***Figures R14E, R14F, R14G***). Ceci suggère que l'infiltration de cellules immunocompétentes est diminuée par le traitement à l'indométhacine, ainsi que le maintien dans le hile de l'accumulation de cellules microgliales activées jusqu'à la fin de l'épileptogenèse. Sur la base de ces observations, il est possible que les cellules qui infiltrent (monocytes circulants, macrophages des leptoméninges) le parenchyme de l'hippocampe entre 8 h et 1 jour après *SE* soient responsables du maintien de l'activation de la microglie 15 jours après *SE* dans le hile.

III.C.2. Effet sur l'induction de l'IL-1β

Nous avions préalablement établi que le profil d'activation de la production d'IL-1β à la suite du *SE* était associé non seulement à l'activation précoce (dès 8 h) des cellules microgliales résidentes mais aussi à l'infiltration de monocytes/macrophages entre 8 h et 1 jour après *SE*. Compte tenu de l'effet inhibiteur de l'indométhacine que nous venons de décrire sur l'infiltration des cellules immunocompétentes « périphériques », nous avons

recherché si le même traitement pouvait altérer la quantité tissulaire de l'IL-1β et sa distribution.

Nous avons mesuré par la technique de RT-PCR étalonnée en temps réel les taux en ARNm de l'IL-1β dans l'hippocampe de rats 8 h/ PiloSE, et de rats 8 h/ PiloSE + Indo, puisque nous avons préalablement établi que le pic apparent d'apparition de son ARNm était localisé 8 h après *SE*. Le traitement à l'indométhacine provoque une atténuation nette du taux de l'ARNm de cette cytokine dans l'hippocampe 8 h après *SE* (~ -65% par rapport aux rats 8 h/ PiloSE) (***Figure R15A***), sans toutefois abolir complètement l'augmentation du taux d'ARNm de cette cytokine. En outre, le traitement à l'indométhacine modifie de façon surprenante la distribution de cette cytokine dans l'hippocampe. En effet, l'IL-1β n'est plus majoritairement contenue dans des cellules microgliales (***Figure R15B***), mais plutôt dans des cellules qui ressemblent à des astrocytes chez les rats 1 j/ PiloSE + Indo (***Figure R15C***). Cette observation est confirmée par un double marquage fluorescent utilisant les anticorps dirigés contre l'IL-1β et contre soit CD11b (marqueur des cellules immunocompétentes), soit la GFAP (marqueur des astrocytes). En effet, nous avons montré que l'IL-1β était majoritairement contenue dans des cellules CD11b positives ramifiées et de forme ronde dans la couche moléculaire du GD des rats 1 j/ PiloSE (***Figure R15F***), alors qu'elle est principalement contenue dans des cellules GFAP positives dans cette même région chez les rats 1 j/ PiloSE + Indo (***Figure R15I***).

III.C.3. Effet sur la dégénérescence neuronale et l'astrocytose

Le traitement à l'indométhacine modère la très forte augmentation précoce du taux de l'ARNm de l'IL-1β, et modifie le type cellulaire qui présente cette cytokine en faveur des astrocytes. Nous avons alors recherché si ces modifications modulaient également la dégénérescence précoce des neurones du hile et l'astrocytose réactionnelle.

Nous avons observé que le traitement à base d'indométhacine ne modifie ni la cinétique de mise en place, ni l'ampleur des processus neurodégénératifs dans le hile, comme l'indiquent les colorations au Fluorojade B réalisées sur les coupes de cerveaux de rats 1 j/ PiloSE et 15 j/ PiloSE et de rats 1 j/ PiloSE + Indo et 15 j/ PiloSE + Indo (***Figures R16A, R16B, R16C, R16D***). En revanche, le traitement à l'indométhacine amplifie l'astrocytose du hile dès 1 jour après *SE* (***Figures R16F, R16H***). Les astrocytes marqués dans le hile des rats 4 j/ PiloSE + Indo présentent par ailleurs plus de ramifications que ceux des rats n'ayant pas bénéficé du traitement par l'indométhacine (***Figures R16G, R16I***).

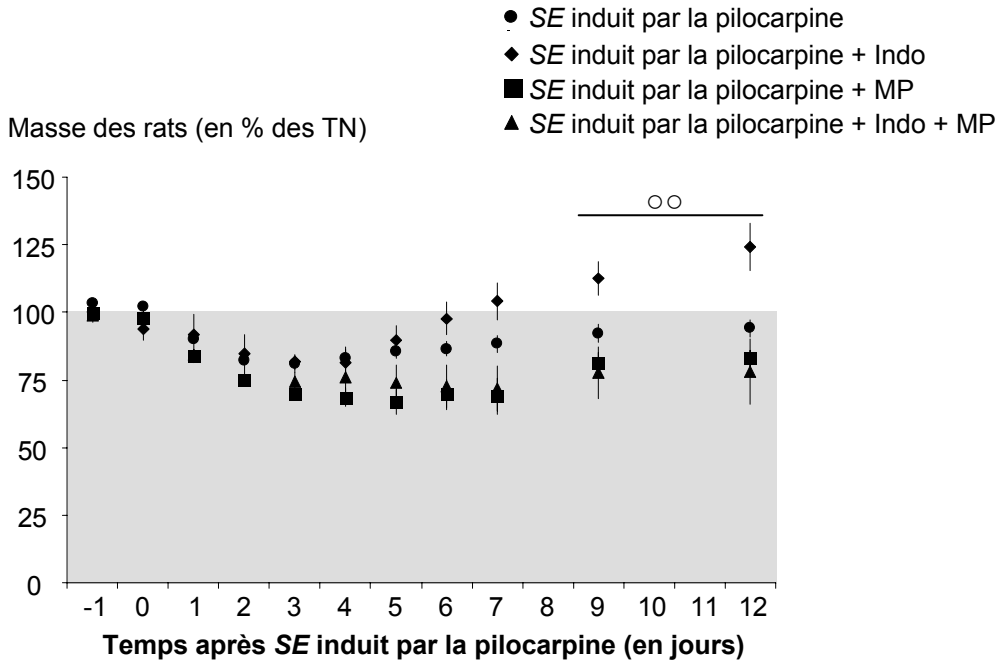


Figure R11 : Effets des anti-inflammatoires sur la récupération des rats ayant développé un *SE* induit par la pilocarpine - Index de la masse corporelle

La masse corporelle des rats est relevée avant et après le traitement à la pilocarpine. Après le traitement à la pilocarpine, on distingue cinq groupes de rats : les rats témoins naïfs (TN), les rats ayant développé un *SE* (●), les rats ayant développé un *SE* et ayant bénéficié du traitement à base d'indométhacine (♦), les rats ayant développé un *SE* et ayant bénéficié du traitement à base de méthylprédnisolone (■), et enfin, les rats ayant développé un *SE* et ayant bénéficié du mélange d'anti-inflammatoires (▲) (voir *Matériels et méthodes*). Pour chaque temps après le traitement à la pilocarpine, la masse corporelle des rats de chaque groupe est exprimée en pourcentage de celle des rats TN au même temps. Le traitement à base d'indométhacine favorise la récupération de masse corporelle chez les rats ayant développé un *SE*. Test statistique ANOVA II suivie d'un test Fisher LSD : ○○, $p<0,01$.

Abréviations : TN, témoins naïfs; SE, *Status Epilepticus*; Indo, Indométhacine: MP, méthylprednisolone.

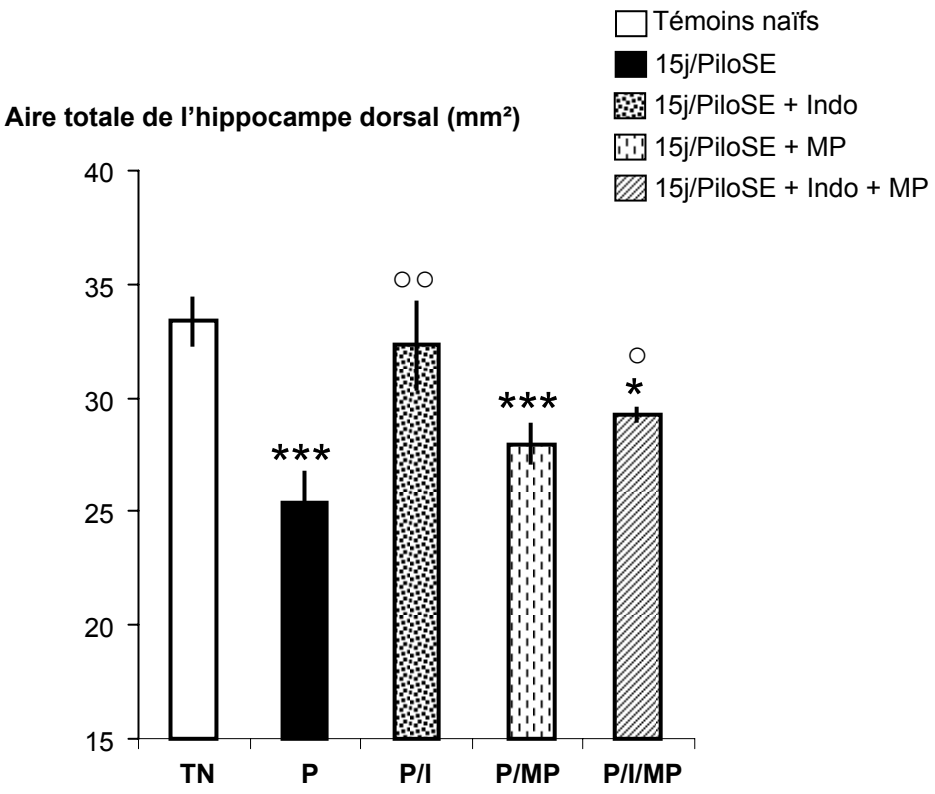


Figure R12 : Effets des anti-inflammatoires sur l'atrophie de l'hippocampe observée 15j après *SE* induit par la pilocarpine

La surface de l'hippocampe est mesurée en utilisant le logiciel d'analyse d'image visolog version 6.3 sur les coupes colorées au crésyl violet de cerveaux de rats TN (n=3), de rats 15j/PiloSE (noté P)(n=5), de rats 15j/PiloSE + Indo (noté P/I) (n=2), de rats 15j/PiloSE + MP (noté P/MP) (n=4), et enfin, de rats 15j/PiloSE + Indo + MP (noté P/I/MP) (n=3) (voir *Matériels et méthodes*). La surface de l'hippocampe dorsal est mesurée le long de l'axe rostro-caudal pour chacun des groupes et la surface totale (somme des surfaces de chacun des 8 plans représentés en R1) est représentée. Test statistique ANOVA II suivie d'un test Fisher LSD : *, $p<0,05$; ***, $p<0,001$ par comparaison avec les rats TN; ○, $p<0,05$; ○○, $p<0,01$, par rapport au rats 15j PiloSE. Seul le traitement à base d'indométhacine est efficace pour prévenir le développement d'une atrophie de l'hippocampe après *SE*.

Abréviations : TN, témoins naïfs; P ou PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; I ou Indo, Indométhacine MP, méthylprednisolone.

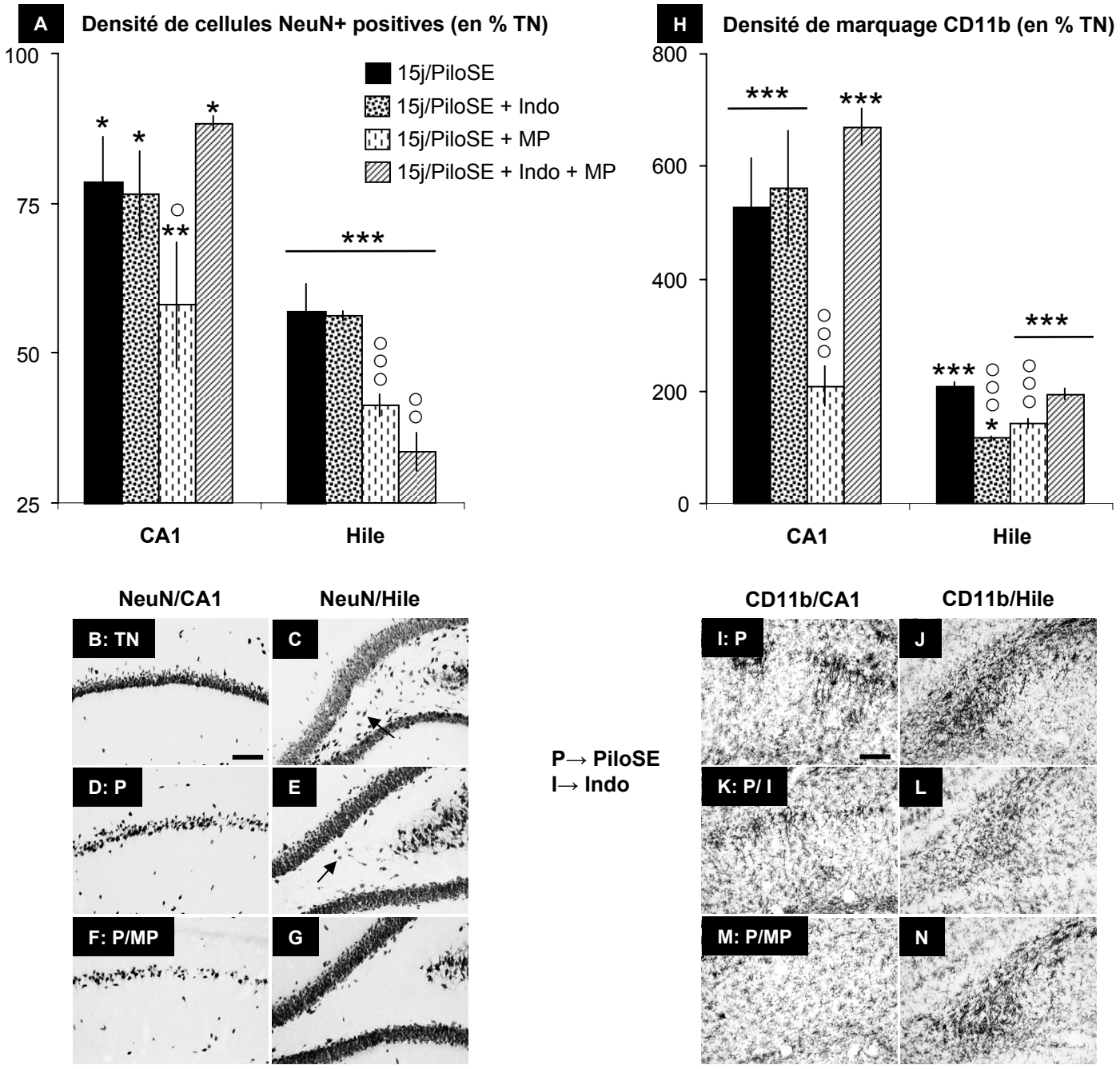


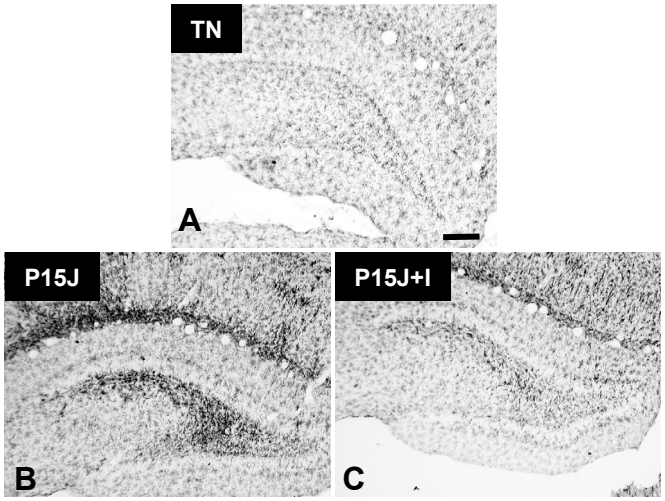
Figure R13 : Effets des anti-inflammatoires sur la perte des neurones et la réactivité de la microglie dans l'hippocampe observée 15j après *SE* induit par la pilocarpine

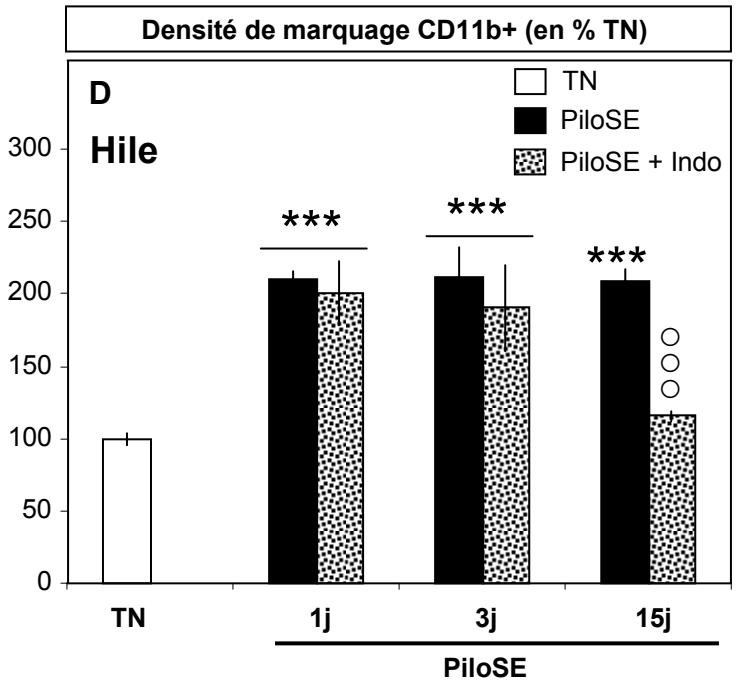
(légende voir page suivante)

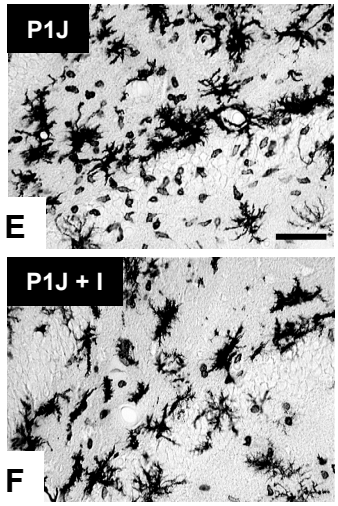
Figure R13 : Effets des anti-inflammatoires sur la perte de neurones et la réactivité de la microglie dans l'hippocampe observées 15j après *SE* induit par la pilocarpine

La densité de cellules NeuN-positives est représentée dans CA1 et dans le hile 15j jour après *SE* chez les rats n'ayant bénéficié d'aucun traitement anti-inflammatoire (15j/PiloSE, n=3), chez les rats ayant bénéficié d'un traitement à base d'indométhacine (15j/PiloSE + Indo, n=2), chez les rats ayant bénéficié d'un traitement à base de méthylprednisolone (15j/PiloSE + MP, n=4), et enfin chez les rats ayant bénéficié d'un mélange d'anti-inflammatoires (15j/PiloSE + Indo + MP, n=3) (**A**) (voir *Matériels et méthodes*). Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: *, p<0,05; **, p<0,01;***, p<0,001 par comparaison avec les rats TN (n=4) ; ○, p<0,05, ○○, p<0,01, ○○○, p<0,001 par comparaison avec des rats 15j PiloSE. Cellules NeuN-positives (NeuN, marqeur de neurones) de CA1 (**B**, **D**, **F**) et du hile (**C**, **E**, **G**) de rats TN (**B**, **C**), de rats 15j/PiloSE (noté P) (**D**, **E**), et de rats 15j/PiloSE + MP (noté P/MP) (**F**, **G**). Le hile des rats 15j/PiloSE + MP présente très peu de cellules NeuN positives (**G**) par comparaison avec des rats TN et des rats 15j/PiloSE (Têtes de flèches pleines, **C** et **E**). La densité de marquage CD11b est représentée dans CA1 et dans le hile en fonction des différents groupes précédemment cités (**H**). Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: *, p<0,05; ***, p<0,001 en comparaison des rats TN ; ○○○, p<0,001 en comparaison des rats 15j/PiloSE. Immunoréactivité de CD11b dans CA1 (**I**, **K**, **M**) et dans le hile (**J**, **L**, **N**) de rats 15j/PiloSE (noté P) (**I**, **J**), de rats 15j/PiloSE + Indo (noté P/I) (**K**, **L**), et enfin de rats 15j/PiloSE + MP (noté P/MP) (**M**, **N**). Le marquage apparaît moins intense dans CA1 des rats 15j/PiloSE + MP (**M**) et dans le hile des rats 15j PiloSE + Indo (**L**) par comparaison avec des rats 15j/PiloSE (**I**, **J**). Barre de mesures: B et I, 100 µm.

Abréviations : TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; Indo, Indométhacine: MP, méthylprednisolone.







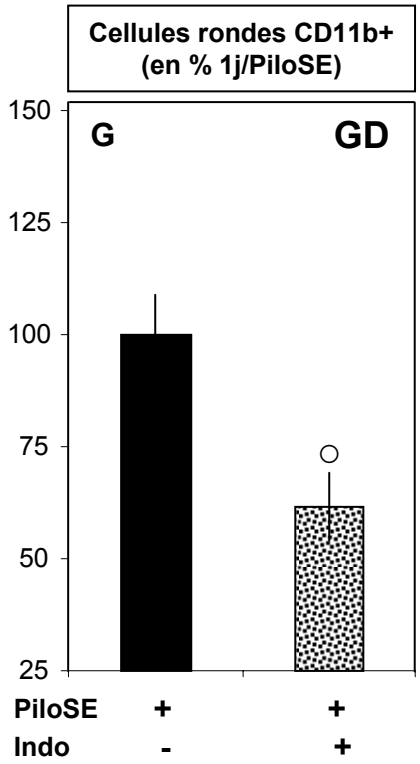


Figure R14 : Effets de l'indométhacine sur la microgliose réactionnelle et sur l'infiltration monocytaire dans le GD après *SE* induit par pilocarpine

Immunoréactivité de CD11b dans le hile de rats TN (**A**), de rats 15j/PiloSE (noté P15J) (**B**), et de rats 15j/PiloSE + Indo (noté P15J+I) (**C**) (voir *Matériels et méthodes*). La densité marquage CD11b est représentée dans le hile en fonction des différents groupes (TN, n=4; 1j/PiloSE, n=3; 1j/PiloSE + Indo, n=3; 3j/PiloSE, n=2; 3j/PiloSE + Indo, n=2; 15j/PiloSE, n=3 et 15j/PiloSE + Indo, n=2) (**D**). Test statistique ANOVA I suivie d'un test de Fisher LSD : ***, p<0,001 par comparaison avec des rats témoins naïfs; ○○○, p<0,001 par comparaison avec des rats 15j/PiloSE. Le traitement à base d'indométhacine n'affecte pas la densité de marquage de CD11b 1j et 3j après *SE*. Cellules CD11b positives du hile de rats 1j/PiloSE (noté P1J) (**E**) et de rats 1j/PiloSE + Indo (noté P1J + Indo) (**F**). Le hile des rats ayant reçu le traitement à l'indométhacine présente moins de cellules rondes CD11b positives (**E**, **F**). Comptage des cellules rondes CD11b positives représenté dans le GD (couche moléculaire + couche granulaire + hile) pour les deux groupes (1j/PiloSE, n=6; 1j/PiloSE + Indo, n=3) (**G**). Test statistique ANOVA I suivie d'un test de Fisher LSD : ○, p<0,05 par comparaison avec des rats 1j PiloSE. Barre de mesure : A, 200 µm; E, 50 µm.
<u>*Abréviations*</u> : TN, témoins naïfs; PiloSE, *status epilepticus* induit par la pilocarpine; GD, gyrus denté; Indo, indométhacine.

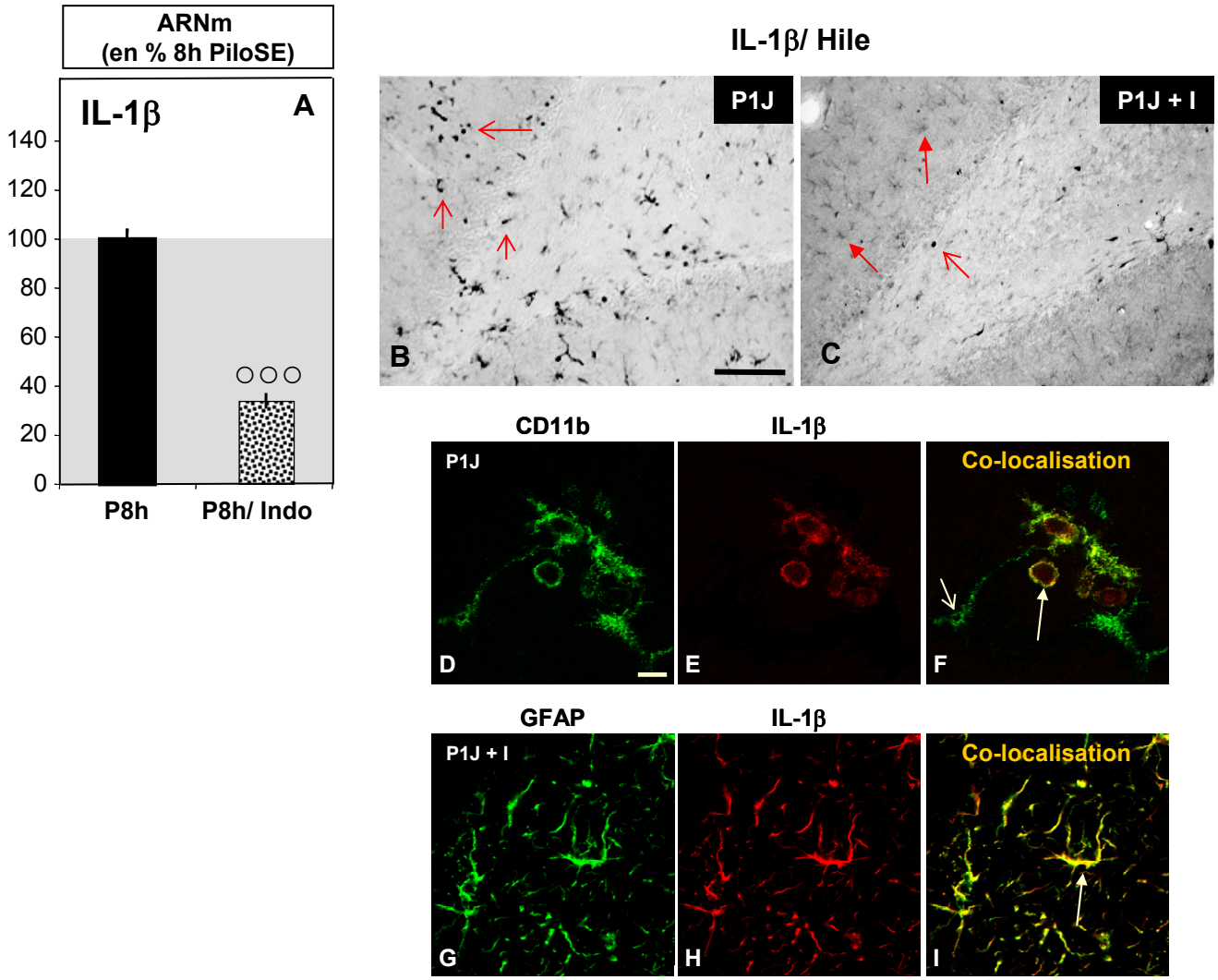


Figure R15 : Effets de l'indométhacine sur l'augmentation du taux de l'ARNm de l'IL-1β et sur la répartition de cette cytokine dans l'hippocampe après *SE* induit par la pilocarpine

L'effet de l'indométhacine est estimé sur la forte augmentation observée dans l'hippocampe 8h après *SE* du taux de l'ARNm de l'IL-1β (**A**). Le nombre de copies d'ADNc est obtenu par quantification à l'aide de la méthode de RT-PCR étalonnée en temps réel (voir *Matériels et méthodes*). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport à la valeur moyenne du nombre de copies déterminée dans l'hippocampe des rats 8h après *SE* (8h/PiloSE) (n=5). Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: ○○○, $p<0,001$ en comparaison des rats 8h/PiloSE. Cellules IL-1β-positives dans la région du hile de l'hippocampe de rats ayant développé un *SE* 1 jour auparavant (P1J) (**B**) et de rats ayant développé un *SE* 1 jour auparavant et ayant bénéficié d'un traitement à base d'indométhacine (P1J + I) (**C**). De nombreuses cellules rondes sont fortement marquées dans la couche moléculaire du GD 1 jour après *SE* (Têtes de flèches vides, **B**), alors que des cellules à la morphologie gliale sont faiblement marquées 1 jour après *SE* chez les rats ayant bénéficié du traitement à base d'indométhacine (Têtes de flèches pleines, **C**). Quelques cellules rondes sont également fortement marquées chez ces derniers (Tête de flèche vide, **C**). Cellules CD11b positives (CD11b, marqueur de cellules immunocompétentes) (**D**) et IL-1β-positives (**E**) dans les régions du hile de l'hippocampe de rats P1J, et cellules GFAP positives (GFAP, marqueur d'astrocytes) (**G**) et IL-1β-positives (**H**) dans les régions du hile de l'hippocampe de rats P1J + I. Notez que chez les rats P1J, certaines cellules CD11b positives sont également IL-1β positives (Tête de flèche pleine, **F**), bien que d'autres ne le sont pas (Tête de flèche vide, **F**). Chez les rats P1J+I, de nombreuses cellules GFAP-positives contiennent l'IL-1β (**I**). Barres de mesure: B, 100 µm; D, 10 µm.

Abréviations : PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; P8h, 8h après *SE*; IL-1β, interleukine-1 béta; Indo; indométhacine; GFAP, Protéine acide fibrillaire gliale.

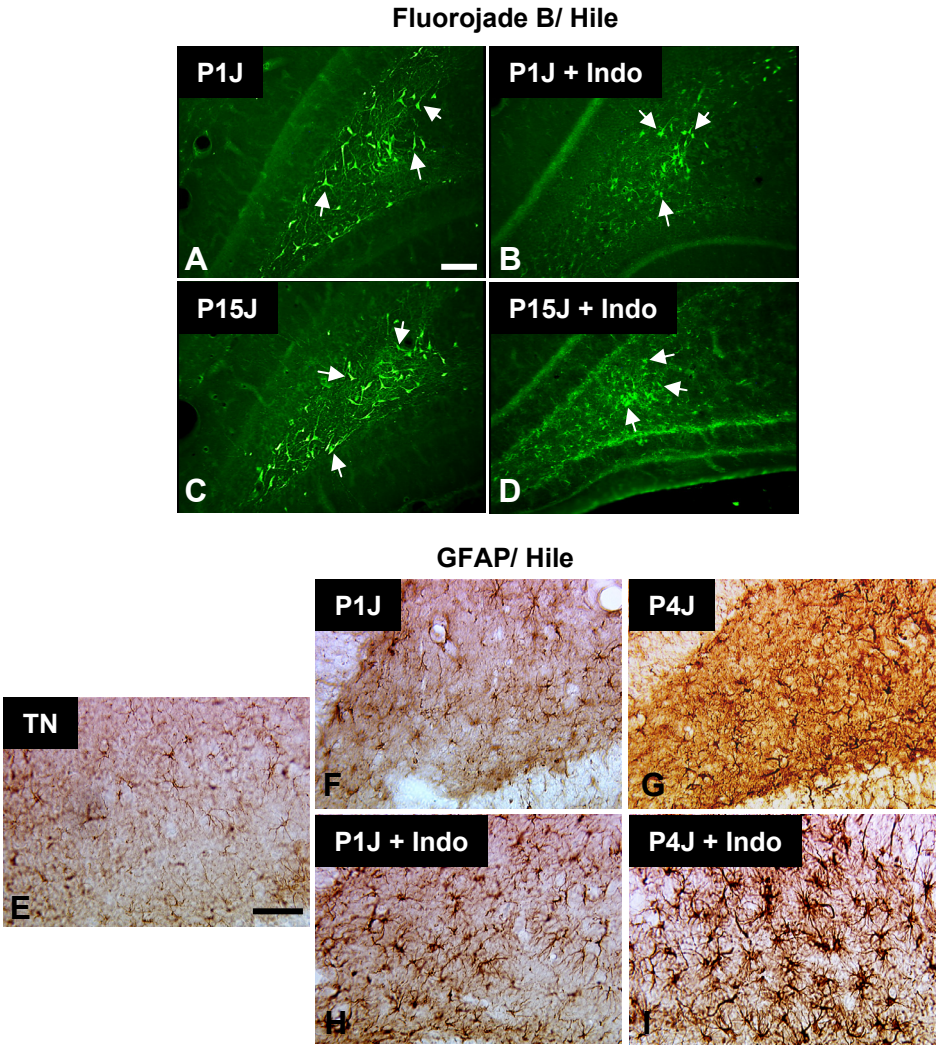


Figure R16 : Effets de l'indométhacine sur la neurodégénérescence et l'astrocytose après *SE* induit par pilocarpine

Coupes de cerveaux perfusés après coloration au Fluorojade B (marqueur de neurones dégénérescents) montrant les régions du hile (**A** à **D**) de l'hippocampe de rats 1j/PiloSE (noté P1J) (**A**) et 15j/PiloSE (noté P15J) (**C**) et des mêmes groupes de rats ayant, en revanche eux, bénéficiés d'un traitement à base d'indométhacine (noté P1J + Indo, **B**; et P15J +Indo; **D**) (voir *Matériels et méthodes*). Quel que soit le groupe, le hile présente de nombreux neurones dégénérescents (flèche blanche, **A**, **B, C, D**). Cellules GFAP positives (GFAP, marqueur d'astrocytes) dans le hile (grossissement x10) (**E**, **F**, **G**, **H, I**) de rats TN (**E**), et de rats P1J (**F**), P4J (**G**), P1J+ Indo (**H**) et P4J+ Indo (**I**). Les cellules GFAP positives sont plus abondantes dans le hile des rats P1J + Indo et P4J + Indo par rapport à celui des rats P1J et P4J respectivement. Barres de mesure: A, 50 µm; E, 100 µm.
Abréviations : TN, témoins naïfs; Indo, indométhacine; GFAP, Protéine acide fibrillaire gliale.

III.D. SYNTHESE ET ELEMENTS DE DISCUSSION

III.D.1. Effets délétères du traitement à la methylprednisolone

Contrairement aux bénéfices (mêmes limités) qu'offre le traitement à la méthylprednisolone dans la moelle épinière après lésion [42], ce traitement administré à l'issue du *SE* exacerbe les dommages neuronaux au niveau de l'hippocampe 15 jours après *SE*. Pourtant, ce traitement anti-inflammatoire a bien permis une atténuation de la cicatrice « microgliale » observée dans les régions lésées 15 jours après *SE*, ce qui suggère que la méthylprednisolone puisse avoir des effets propres sur les cellules de la microglie et des effets propres sur les neurones. La vulnérabilité des neurones de l'hippocampe aux glucocorticoïdes de synthèse pourrait être une exception compte tenu que cette région cérébrale est particulièrement enrichie en récepteurs des glucocorticoïdes [50]. Néanmoins, une étude précédente révèle que le traitement à la méthylprednisolone exacerbe également la mort des neurones ganglionnaires de la rétine dans le cas de neurite optique expérimentale [59], ce qui indique que les effets délètères de la méthylprednisolone ne sont pas restreints à l'hippocampe. En clinique, il a clairement été montré que les fortes doses de glucocorticoïdes ne réduisent pas l'œdème post-ischémique ; au contraire, elles aggraveraient le devenir des patients. Des conclusions similaires ont été données chez des victimes de traumatisme crânien [272]. Au regard de nos résultats après l'induction expérimentale du *SE* par la pilocarpine, l'administration de fortes doses de glucocorticoïdes chez des patients victimes de *SE* convulsivant lors de leur prise en charge dans des unités d'urgence neurologique pourrait s'avérer désastreuse pour les neurones de l'hippocampe, en particulier les cellules du hile, et favoriser ainsi la transformation épileptique du tissu cérébral.

III.D.2. Efficacité limitée du traitement à l'indométhacine

Effet sur l'atrophie de l'hippocampe : Nos résultats expérimentaux révèlent que le traitement à l'indométhacine administré à l'issue du *SE* est efficace pour prévenir le développement d'une atrophie de l'hippocampe. Comme abordé précédemment (voir paragraphe I.A.4 des résultats), l'atrophie de l'hippocampe développé à la suite d'un *SE* serait responsable chez le rat d'une altération des aptitudes mnésiques lors de tests d'orientation spatiale [196]. Il se pourrait alors que la prévention du développement de l'atrophie par l'indométhacine permette également une préservation des capacités cognitives chez les rats rendus épileptiques. Si tel était le cas, l'indométhacine s'avérerait un traitement à envisager pour prévenir de l'apparition de déficits cognitifs chez le patient épileptique.

Effet sur les pertes des neurones : Le traitement à l'indométhacine ne modifie pas la survie des neurones vulnérables de l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine. Ces résultats sont en contradiction avec ceux d'une étude précédente qui montre que l'administration d'indométhacine exacerbe la mort des neurones pyramidaux de CA1 et de CA3 à la suite d'un *SE* induit par l'acide kaïnique [12]. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que nous n'avons pas utilisé le même protocole de traitement à l'indométhacine dans notre étude, ni le même mode d'induction du *SE*. En effet, dans cette étude précédente, une seule dose d'indométhacine (10 mg/kg) était injectée avant l'induction du *SE* par l'acide kaïnique et se révélait pro-épileptogène, puisqu'elle augmentait le nombre de crises développées au cours du SE, ainsi que le taux de mortalité des rats. En revanche, dans notre protocole, l'indométhacine a été injectée à l'issue du *SE* induit par la pilocarpine. En outre, une étude antérieure indique qu'une simple injection d'indométhacine avant l'induction du *SE* par la pilocarpine ne provoque aucun effet ni sur le nombre de crises développées ni même sur la sévérité de ces crises [121], ce qui suggère que les effets pro-épileptogène et délétères de l'indométhacine pourraient être dépendants du mode d'induction du *SE* utilisée.

Effet sur l'infiltration de monocytes/macrophages et sur la gliose réactionnelle : L'indométhacine limite partiellement l'infiltration de cellules immunocompétentes « périphériques » dans le GD 1 jour après *SE*. Nous avons rapproché ce résultat de la diminution du maintien de l'activation de la microglie dans le hile 15 jours après *SE*. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus après irradiation. En effet, de faibles doses d'indométhacine diminue dans l'hippocampe non seulement le recrutement de monocytes périphériques, mais aussi l'accumulation totale de cellules microgliales activées 2 mois après irradiation [179]. Le processus de recrutement de monocytes circulants est dépendant du statut des cellules endothéliales qui, lorsqu'elles sont activées, produisent du côté luminal des molécules d'adhérence pour faciliter l'accrochage de cellules immunocompétentes circulantes. Etant donné que les cellules endothéliales sont activées dans un contexte inflammatoire, il est possible que le traitement à l'indométhacine ait affecté ce mécanisme. En outre, la production de l'IL-1β semble atténué à la suite du *SE* par notre protocole de traitement à l'indométhacine. Une inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires par les monocytes circulants a déjà été décrite dans des cellules en culture, à la suite de l'administration d'indométhacine [131]. Il est possible que notre protocole de traitement à l'indométhacine inhibe la production d'IL-1β par le contingent de monocytes/ macrophages présent dans l'hippocampe à la suite du *SE* induit par la pilocarpine. En outre, nous sommes les premiers à décrire que le traitement à l'indométhacine modifie profondément la distribution tissulaire de cette cytokine dans l'hippocampe à la suite du *SE*.

De plus amples investigations sont nécessaires pour comprendre le rôle de la production précoce de l'IL-1β par les astrocytes réactifs de l'hippocampe à la suite du *SE* et du traitement à l'indométhacine. Nos observations indiquent que ce phénomène original n'a pas modifié le profil de la neurodégénérescence à la suite du *SE*. En revanche, nous avons décelé un effet bénéfique du traitement à l'indométhacine sur les astrocytes du hile 1 jour après *SE*, au moment même où il a été décrit que ces astrocytes dégénéraient en l'absence de traitement par l'indométhacine [29,136]. Cet effet bénéfique pourrait être, à lui seul, responsable de la prévention du dévéloppement de l'atrophie.

L'effet de l'indométhacine ne permet qu'une limitation partielle de l'infiltration de cellules immunocompétentes à forme amiboïde (monocytes circulants et/ou macrophages dérivés des leptoméninges) dans le parenchyme de l'hippocampe dans la phase précoce de l'épileptogenèse, et ceci n'altère pas la mise en œuvre des processus neurodégénératifs. Toutefois, nous montrons ici que la réduction de l'infiltration par les monocytes est suivie par, près de 2 semaines plus tard, d'une réduction de la cicatrice « microgliale ». Ce dernier résultat est un argument qui plaide fortement en faveur de l'explication selon laquelle le maintien de la réactivité microgliale observée longtemps après le *SE* serait dû à la différenciation des monocytes infiltrants en cellules de la microglie, et non pas au maintien de la microglie résidente dans un état d'activation important. Il est toutefois très difficile d'établir, une fois les cellules infiltrantes entrées dans le tissu, le rôle qu'elles joueraient sur la mise en place des processus épileptogénes, tels que la mort des neurones vulnérables. La dernière partie de ce travail a porté sur la caractérisation de la production de l'héparanase dans le cerveau, à l'état basal d'une part, puis au cours de l'épileptogenèse d'autre part.

IV. Etude du système héparanase et des chaînes de sulfate d'héparane dans l'hippocampe de rat à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine : Implication dans l'infiltration monocytaire ?

Comme abordé précédemment (voir paragraphes IV.B.2 et IV.B.3 de l'historique scientifique), l'héparanase confère aux cellules qui l'expriment à leur surface (principalement les cellules métastatiques et les cellules immunocompétentes circulantes) des capacités invasives. Avant de rechercher si les cellules infiltrantes que nous observons transitoirement dans notre modèle expriment à leur surface l'héparanase, une étape préliminaire nous a semblé essentielle : il s'agit de la caractérisation de l'expression de cette enzyme par le tissu cérébral dans les conditions physiologiques.

IV.A. CARACTERISATION DE LA SYNTHESE DE L'HEPARANASE DANS LE CERVEAU

La synthèse de l'héparanase a longtemps été restreinte aux organes lymphoïdes. Ces dernières années, l'héparanase a été détectée dans d'autres tissus tels que le placenta ou le derme, et sa présence dans ces tissus est à mettre en relation avec les cellules invasives non immunes qui y siègent, les cytotrophoblastes du placenta par exemple. Ainsi, la présence constitutive de l'héparanase a été considérée comme étant limitée aux tissus soumis à un remodelage structural permanent. Dans le cerveau, trois régions sont également le siège de modifications structurales importantes tout au long du développement, cette dynamique étant maintenue à l'âge adulte. Il s'agit du néocortex, de l'hippocampe et du bulbe olfactif. En effet, des cellules souches neurales donnent en permanence naissance à de nouveaux contingents de neurones, dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) et dans l'hippocampe, dans la zone sous-granulaire (ZSG) du GD. Au cours de leur migration et de leur différenciation, les neuroblastes vont devoir se frayer un chemin jusqu'à leur destination finale, long de quelques micromètres pour ceux formés dans la ZSG et qui intégrent la couche granulaire du GD, beaucoup plus long pour ceux formés dans la ZSV et qui doivent atteindre au travers du néocortex les bulbes olfactifs. Ces migrations cellulaires d'une part et l'élaboration des connexions neuronales d'autre part, doivent ainsi faire appel à des mécanismes similaires à ceux décrits dans les tissus soumis à un remodelage structural physiologique. Dans ce contexte de plasticité structurale, nous avons recherché dans un premier temps si l'héparanase était présente dans différentes régions du cerveau qui présentent, à l'âge adulte, des plasticités structurales différentes et, dans un second temps, si l'expression du gène de l'héparanase était

soumise à des régulations importantes au cours du développement postnatal, période durant laquelle les changements structuraux sont nombreux.

IV.A.1. Production constitutive de l'héparanase dans différentes régions du cerveau

Chez les rats âgés de 3 mois, l'ARNm de l'héparanase est fortement détecté dans toutes les structures cérébrales étudiées. L'hippocampe, le néocortex et le bulbe olfactif présentent une concentration tissulaire de l'ARNm de l'héparanase similaire, qui est plus importante que celle mesurée dans le thalamus et dans l'hypothalamus (***Figure R17A***). L'héparanase est également détectée dans toutes les structures cérébrales analysées, comme illustré au niveau du CA1 (***Figure R17B***) et du néocortex (***Figure R17C***). La spécificité de l'anticorps anti-héparanase de rat est démontrée par l'absence de signal fluorescent lorsqu'il est au préalable incubé avec les deux peptides antigéniques pendant une nuit avant son application sur les coupes de cerveau (***Figures R17D, R17E***).

Le double marquage réalisé en utilisant les anticorps dirigés contre l'héparanase et contre la protéine NeuN (marqueur spécifique de neurones) montre que la présence de l'héparanase est restreinte aux populations neuronales, comme illustré dans l'hippocampe (***Figures R18A, R18B, R18C***) et dans le néocortex (***Figures R18D, R18E, R18F***). En particulier, nous avons observé que l'héparanase est contenue dans les prolongements dendritiques dans ces deux aires cérébrales (*Flèches blanches*, ***Figures R18A, R18D***). Par ailleurs, à l'état basal, nous n'avons jamais détecté la présence d'héparanase dans des cellules microgliales (CD11b positives), ni même dans des astrocytes (GFAP positifs) (*données non illustrées*).

IV.A.2. Synthèse de l'héparanase dans le cerveau au cours du développement post-natal et du vieillissement

Au regard des résultats ci-dessus, l'héparanase est présente exclusivement dans les neurones et sa quantité est plus importante dans les aires cérébrales qui présentent une grande plasticité structurale. Nous avons alors recherché si des situations physiologiques associées à de profonds remodelage struturaux, comme ceux observés au cours du développement post-natal, pouvait altérer la production de l'héparanase dans le cerveau.

La quantité d'ARNm de l'héparanase mesurée dans l'hippocampe (***Figure R19A***), le néocortex (***Figure R19B***) et le bulbe olfactif (***Figure R19C***) varie significativement dans ces structures au cours du développement post-natal et du vieillissement ($p<0,001$, ANOVA I

dans chacune des structures cérébrales). L'hippocampe et le néocortex présentent des variations de taux d'ARNm assez similaires, contrairement au bulbe olfactif. En effet, dans l'hippocampe (***Figure R19A***) et le néocortex (***Figure R19B***), les quantités d'ARNm de l'héparanase le plus élevé sont observées dans les premiers jours de vie post-natale (deuxième et cinquième jours), alors que le pic apparent est observé au septième jour de vie post-natale dans le bulbe olfactif (***Figure R19C***). De plus, une augmentation significative du taux d'ARNm de l'héparanase est détectée entre l'âge de 3 mois (ce qui correspond au jeune adulte) et 12 mois (ce qui correspond à un rat assez âgé) uniquement dans l'hippocampe (***Figure R19A***) et le néocortex (***Figure R19B***).

L'analyse de l'immuno-emprunte de l'héparanase révèle que les deux formes, précurseur de 65 kDa et forme active de 50 kDa, sont toutes deux détectées dans le néocortex (***Figure R20A***) et dans l'hippocampe (*donnée non illustrée*), au cours du développement post-natal et du vieillissement. Pour chaque âge, la forme active (50 kDa) est plus abondante que la forme précurseur (65 kDa) (***Figure R20A***). Le taux le plus bas de la forme précurseur est observé au deuxième jour de vie post-natale, et augmente graduellement jusqu'à l'âge adulte (3 mois) pour rester stable au cours du vieillissement (***Figure R20A***). En revanche, la forme active est très abondante au deuxième jour de vie post-natale, puis sa quantité décroît dès la deuxième semaine de vie post-natale pour rester stable jusqu'au douxième mois (***Figure R20A***). Le rapport entre la forme active et la forme précurseur atteint alors sa valeur maximale au deuxième jour de vie post-natale (***Figure R20A***).

Un signal dense sous la forme de « petits points » est observé dans le *stratum radiatum* de l'aire CA1 au cinquième jour de vie post-natale par la détection immunohistochimique (***Figure R20B***). Il est possible que ce signal punctiforme corresponde dans l'hippocampe à la présence de l'enzyme dans de nombreuses varicosités neuronales. Ceci est conforté par le fait que l'enzyme est présente dans les prolongements neuronaux dans le néocortex au même âge (***Figure R20C***). Le signal punctiforme augmente en densité au sein du neuropile au cours du développement et du vieillissement dans le néocortex (***Figure R20E***). Au cinquième jour de vie post-natale, l'héparanase n'est détectée ni dans les corps cellulaires des neurones granulaires du GD (*donnée non illustrée*), ni dans les neurones pyramidaux de la Corne d'Ammon (***Figure R22B***). Dans le néocortex, l'enzyme n'est également pas détectée dans les corps cellulaires des neurones (***Figure R20C***). En revanche, la présence de l'héparanase est détectée dans les périkaryons de presque tous les neurones dès le vingt-et-unième jour post-natal (***Figures R17B, R17C***) et ce jusqu'à 12 mois (***Figures***

R20D, R20E), alors qu'elle n'est détectée dans les corps cellulaires des cellules en grain du GD qu'à l'âge de 12 mois (*donnée non illustrée*).

IV.A.3. Induction de la production de l'héparanase au cours de la neuritogenèse

Que la production de l'héparanase soit altérée au cours du développement post-natal et que cette enzyme soit contenue dans les prolongements neuronaux à l'âge adulte mais aussi à certains stades du développement post-natal, nous a conduit à considérer que l'héparanase pouvait jouer un rôle au cours de la différenciation des neurones en particulier au cours de la pousse axonale et de la dendritogenèse. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons eu recours à la culture de cellules de la lignée PC12 qui, lorsqu'elles sont incubées en présence de NGF, se différencient en cellules de type neuronal.

L'ARNm de l'héparanase est présent de façon constitutive dans les cellules de la lignée PC12, et son taux n'est pas affecté par la densité cellulaire (*donnée non illustrée*). Au cours de la différenciation induite par le NGF, nous avons observé une augmentation graduelle du taux d'ARNm de l'héparanase, avec une induction de +413% et de +1861% après 1 jour et 3 jours de traitement par le NGF (cellules au jour 0 (J0), c'est-à-dire, avant l'addition de NGF dans le milieu de culture) (***Figure R21***). Cette augmentation du taux d'ARNm de l'héparanase au cours de la différenciation neuronale induite par le NGF est associée à la présence de la protéine dans les extensions neuritiques (*flèches noires,* ***Figure R21B***). La forme précurseur de l'héparanase (65 kDa) est détectée à un taux similaire entre les cellules PC12 indifférenciées (J0) et les cellules différenciées après 3 jours de traitement par le NGF (J3), contrairement à la forme active qui est clairement plus abondante dans les cellules différenciées en culture par rapport aux cellules indifférenciées (***Figure R21C***).

IV.B. EXPRESSION ET DISTRIBUTION DE L'HEPARANASE DANS L'HIPPOCAMPE A LA SUITE D'UN *STATUS EPILEPTICUS* INDUIT PAR LA PILOCARPINE

Dans l'hippocampe, les neurones pyramidaux de la CA et les neurones du hile synthétisent à l'état basal l'héparanase. En outre, cette enzyme est présente dans les cellules invasives (cellules métastatiques, leucocytes) lors de leur pénétration dans les tissus. Compte tenu du fait que nous avons préalablement mis en évidence un phénomène d'infiltration précoce et transitoire par des monocytes/macrophages à la suite du *SE*, nous avons alors étudié la distribution tissulaire de l'héparanase au cours de cette même période.

La détection par immunofluorescence de l'héparanase à la suite du *SE* induit par la pilocarpine confirme que cette enzyme est présente dans le cerveau à l'état basal, où elle est contenue dans les cellules de CA1 de type neuronal et dans les cellules du hile (***Figures R22A, R22B***). Dès 8 h après *SE*, on observe une augmentation de l'intensité du signal dans le CA1, maintenue jusqu'à 4 jours après *SE* (***Figures R22C, R22E, R22G***). Dans le hile, 8 h après *SE*, la couche granulaire apparaît marquée, une situation qui n'avait été observée qu'au cours du vieillissement (*donnée non illustrée*). Un jour après *SE*, de nombreuses cellules de forme ronde produisent de l'héparanase transitoirement (***Figure R22F***) alors que seulement quelques unes de ce type apparaissent marquées 4 jours après *SE* (***Figure R22H***). Un jour après *SE*, nous avons vérifié que les cellules de CA1 qui contiennent l'héparanase (*en vert,* ***Figure R22I***) sont des neurones (marqueur de neurones NeuN *en rouge,* ***Figure R22L***) (***Figure R22K***) et que dans le hile, ce sont les cellules rondes CD11b positives (*en rouge,* ***Figure R22M***) qui contiennent cette enzyme (*en vert,* ***Figure R22L***, ***R22N***).

L'analyse de l'immuno-emprunte de l'héparanase à la suite du *SE* induit par la pilocarpine révèle que 1) les deux formes (précurseur de 65 kDa et forme active de 50 kDa) sont détectées par notre anticorps dans l'hippocampe de rats TN, 2) le taux de la forme active est plus important que celui de la forme précurseur à tous les temps étudiés à la suite du *SE*, et 3) le taux de la forme active est transitoirement augmenté dans l'hippocampe 1 jour après *SE*, au moment même où l'on détecte les cellules infiltrantes dans le parenchyme de l'hippocampe (***Figure R220***). Cette augmentation transitoire de la forme de 50 kDa passe par une diminution du contenu tissulaire de la forme précurseur observée 8h après *SE*, ce qui suggère que la forme précurseur est fortement utilisée entre 8h et 1j après le *SE* pour fournir la forme active de l'héparanase après coupure protéolytique. Par ailleurs, la quantité de la forme active diminue transitoirement 2 jours après *SE*, pour être de nouveau plus importante 3 jours et 7 jours après *SE*. Ceci suggère que la forme active de l'héparanase pourrait être d'abord impliquée dans des processus s'opérant précocément (1 jour après *SE*) dans l'hippocampe, comme l'infiltration des monocytes/macrophages, puis qu'elle soutient d'autres processus mis en place tardivement à la suite du *SE* comme la régénérescence tissulaire. L'augmentation du rapport des quantités des deux formes (50 kDa sur 65 kDa) entre 8 h et 1 j après *SE* dans un premier temps, puis 3 j après *SE* dans un second temps, conforte cette hypothèse (***Figure R220***). En outre, nous avons observé que la quantité du précurseur est augmentée 7 jours après *SE*, ce qui conduit à un nouvel état d'équilibre des formes 50/65 kDa (***Figure R220***). Ce nouvel équilibre ne peut résulter que de l'augmentation de la concentration cellulaire des deux formes (précurseur et active) par les neurones survivants, puisque l'héparanase est essentiellement neuronale à ce temps et que de nombreux neurones ont dégénéré. Ceci est

corroboré par l'augmentation du signal fluorescent comme ceci est illustré dans les neurones pyramidaux de CA1 4 jours après *SE* (***Figure R22G***).

Enfin, nous avons mesuré les contenus en ARNm de l'héparanase dans l'hippocampe de rats TN, et de rats 8 h/ PiloSE, 1 j/ PiloSE, 2 j/ PiloSE, 3 j/ PiloSE et 7 j/ PiloSE. Le *SE* induit par la pilocarpine entraîne dans l'hipppocampe une augmentation transitoire du taux d'ARNm de l'héparanase (***Figure R22P***). Les pics apparents sont localisés 1 jour et 2 jours après *SE*. Cette augmentation pourrait vraisemblablement soutenir de l'augmentation du taux de la forme précurseur observée entre 8 h et 1 jour après *SE*, mais peut également s'expliquer par la présence dans le tissu des cellules infiltrantes qui contiennent fortement l'héparanase (***Figure R22N***). Par ailleurs, le taux d'ARNm de l'héparanase retourne au niveau de base 3 jours après *SE*, et reste stable 7 jours après *SE*, alors que les protéines sont plus abondantes entre 3 et 7 jours après *SE* (***Figures R22P, R22O***). Là encore, le retour au niveau de base (celui observé avant *SE*) est obtenu alors que le nombre de neurones a diminué dans l'hippocampe, indiquant une sur-production de l'héparanase par les neurones survivants. En outre, ces résultats suggèrent que la protéine est moins utilisée à partir du troisième jour à la suite du *SE* et que l'augmentation tardive de la quantité de protéines est due à une accumulation de la protéine stabilisée (diminution de la dégradation).

De cette étude, on constate que l'hippocampe synthétise plus d'héparanase précocément à la suite du *SE*. Ceci est associé à deux événements :

1. une augmentation de la production de l'héparanase par les cellules stromales, en particulier les neurones pyramidaux de CA1 et les cellules en grain du GD.
2. la présence transitoire 1 jour après *SE* de cellules immunocompétentes infiltrantes qui synthétisent l'héparanase.

IV.C. DETECTION DES SITES DE LIAISON DE L'HEPARANASE SUR LES CHAINES DE SULFATE D'HEPARANE A LA SUITE D'UN *SE* INDUIT PAR LA PILOCARPINE.

Etant donné que l'héparanase est présente à la fois dans les neurones pyramidaux et dans les cellules infiltrantes, nous avons recherché dans l'hippocampe où étaient localisés les sites d'action de cette enzyme.

La technique de détection histochimique des chaînes d'HS capables de lier l'héparanase est basée sur l'utilisation d'une séquence peptidique de l'héparanase, à laquelle a été ajoutée une biotine à l'extrémité C-terminal, et une méthode de révélation à la péroxydase

couplée à de l'avidine (voir *Matériels et méthodes*). Cette séquence peptique correspond à la séquence de liaison de l'héparanase aux chaînes d'HS. Grâce à cette technique, nous avons montré que le cerveau des rats témoins naïfs ne présente aucun signal (***Figure R23A***). En revanche, 8 h après *SE*, le hile présente quelques cellules marquées (***Figure R23B***). Ces cellules marquées sont très abondantes dans le hile et dans toutes les couches du GD 1 jour après *SE* (***Figure R23C***), alors qu'aucune d'entre elles n'est encore observable 3 jours après *SE* (***Figure R23D***). Grâce à la double détection utilisant le peptide biotinylé (*en vert*, ***Figure R23E***) et les anticorps dirigés contre CD14 (marqueur de monocytes) (*en rouge,* ***Figure R23F***), nous avons montré que les cellules rondes du hile qui présentent les chaînes d'HS capables de lier l'héparanase sont les cellules immunocompétentes infiltrantes (***Figure R23G***). Lorsque l'on observe plus en détails les cerveaux des rats ayant développé un *SE* 1 jour auparavant, on constate que les cellules rondes marquées sont abondantes dans la bordure leptoméningeale de la couche moléculaire du GD (***Figure R23H***) et du hile (***Figure R23I***). Elles sont aussi détectées en plus faible nombre dans la *SLMo* (une région riche en vaisseaux sanguins) (***Figure R23J***), et de façon sporadique dans la région CA1 (***Figure R23K***).

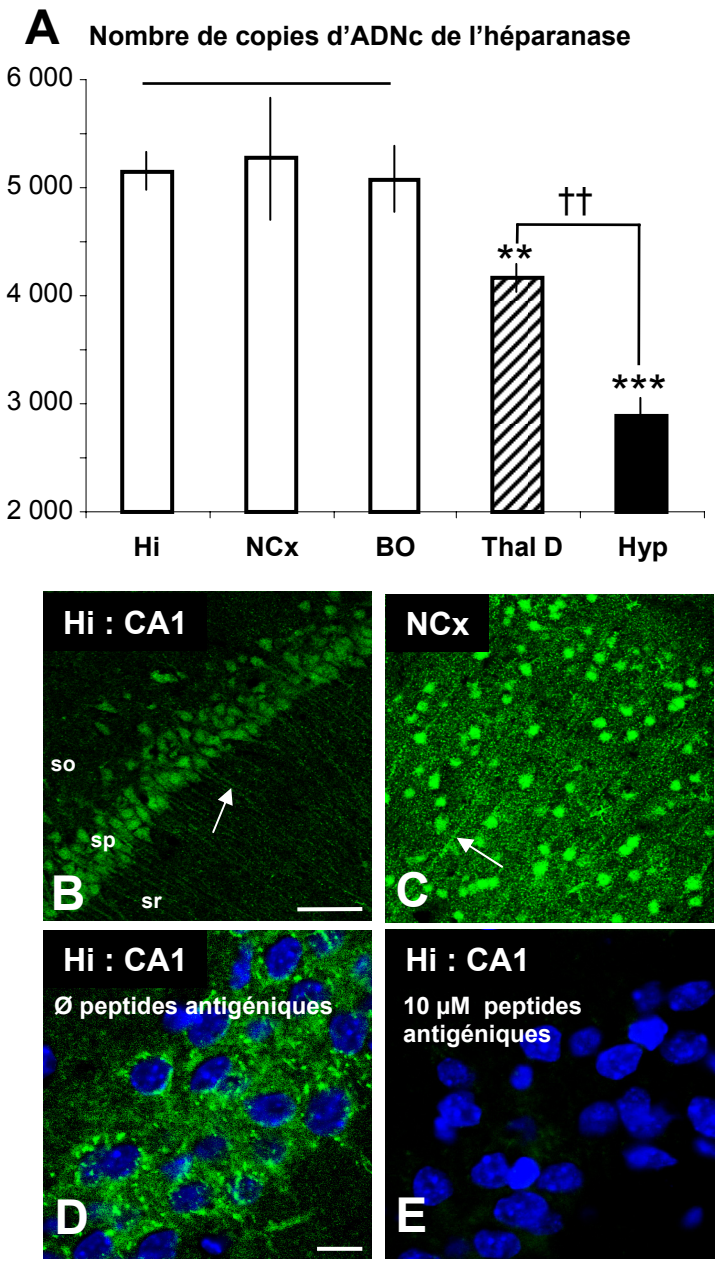


Figure R17 : Distribution de l'héparanase dans différentes régions du cerveau de rat adulte

Taux de l'ARNm de l'héparanase dans l'hippocampe, le néocortex, le bulbe olfactif, le thalamus dorsal et l'hypothalamus à l'âge adulte (**A**). Les résultats sont exprimés en nombre moyen de copies d'ADNc ± sem quantifiées dans 500 ng d'ARN totaux par RT-PCR étalonnée en temps réel. Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: **, p<0,01, ***, p<0,001 par comparaison avec le niveau moyen d'expression de l'ARNm codant pour l'héparanase calculé dans l'hippocampe, le néocortex et le bulbe olfactif (5168 ± 373 copies); **††**, p<0,01, comparaison du niveau d'expression dans le thalamus dorsal et l'hypothalamus. Distribution de l'héparanase immunoréactive dans le CA1 dans l'hippocampe (**B**) et dans le néocortex (**C**). Les prolongements neuronaux sont marqués dans ces deux structures cérébrales (flèches blanches, **B**, **C**). La spécificité de l'anticorps anti-héparanase de rat est vérifée par disparition complète du signal vert fluorescent normalement détecté sur les coupes cérébrales, comme illustré au niveau de CA1 (**D**), après pré-incubation de l'anticorps avec les deux peptides antigéniques (**E**). Le signal bleu fluorescent correspond au marquage nucléaire par le DAPI. Barre de mesure: B, 50 µm; D, 10 µm.
Abréviations : Hi, Hippocampe; NCx, néocortex; BO, bulbe olfactif; Thal D, thalamus dorsal; Hyp, hypothalamus; so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*.

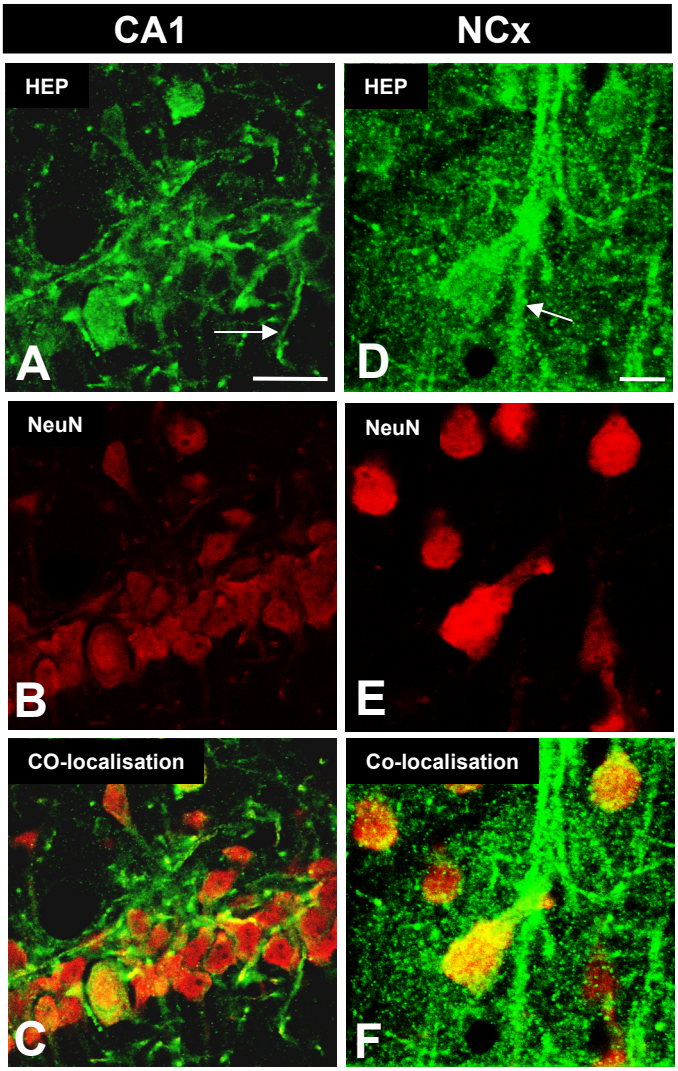


Figure R18 : Mise en évidence de la présence de l'héparanase dans le cerveau de rat

Dans CA1 (**A** à **C**) et dans le néocortex (**D** à **F**), l'héparanase (en vert: **A** et **D**) est strictement contenue dans les neurones (en rouge: **B** et **E**) (co-localisation en **C** et **F**). Les prolongements neuronaux sont marqués dans CA1 et dans le néocortex (flèches blanches, **A** et **D**). Barres de mesure : A, 25 µm; D, 10 µm.
Abréviations: HEP, héparanase; NCX, néocortex.

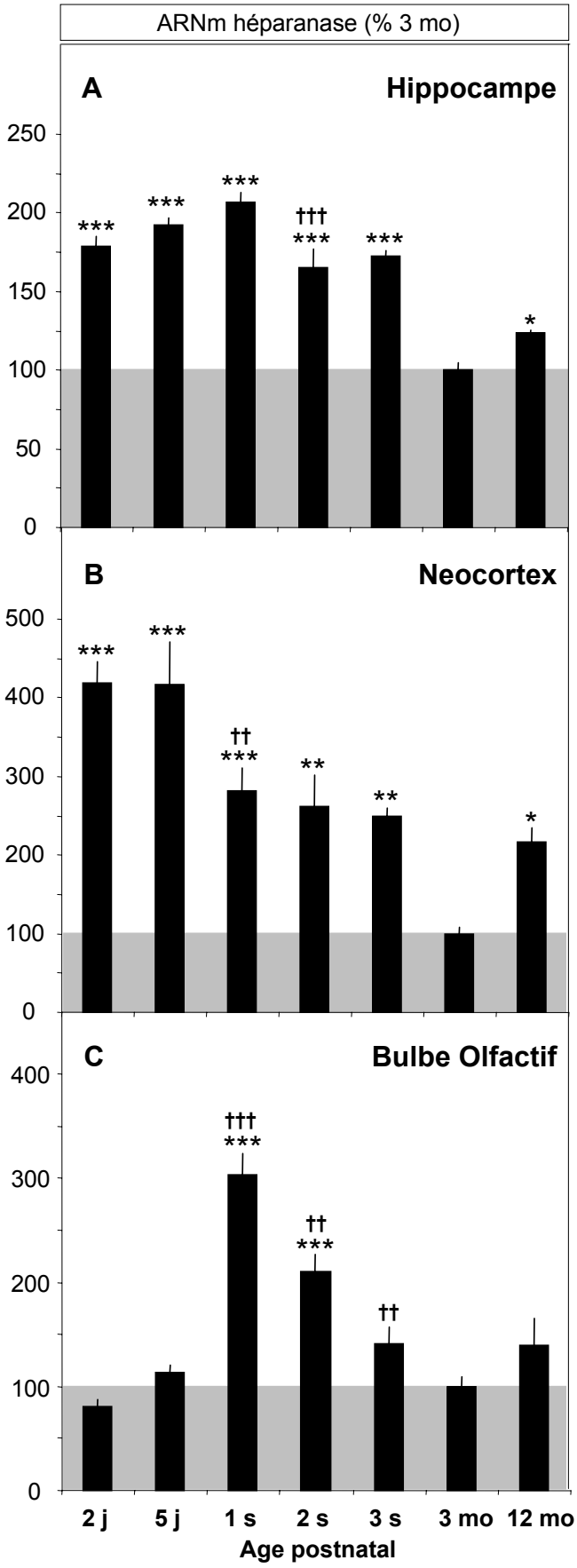


Figure R19 : Taux d'ARNm de l'héparanase dans l'hippocampe, le néocortex et le bulbe olfactif au cours du développement postnatal et du vieillissement.

Variation des taux d'ARNm de l'héparanase dans l'hippocampe (**A**), le néocortex (**B**) et le bulbe olfactif (**C**) au cours du développement post-natal et du vieillissement. Les nombres de copies sont obtenus par la méthode de RT-PCR étalonnée en temps réel réaliséé sur 500 ng d'ARN totaux (voir *Matériels et méthodes*). Les résultats sont exprimés en pourcentage ± sem de la valeur déterminée chez les rats âgés de 3 mois. Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: *, p<0,05; **, p<0,01, ***, p<0,001 par comparaison avec des rats âgés de 3 mois. **††**, p<0,01; **†††**, p<0,001 par comparaison avec l'âge précédent.
Abréviations : j, jour; s, semaine; mo, mois.

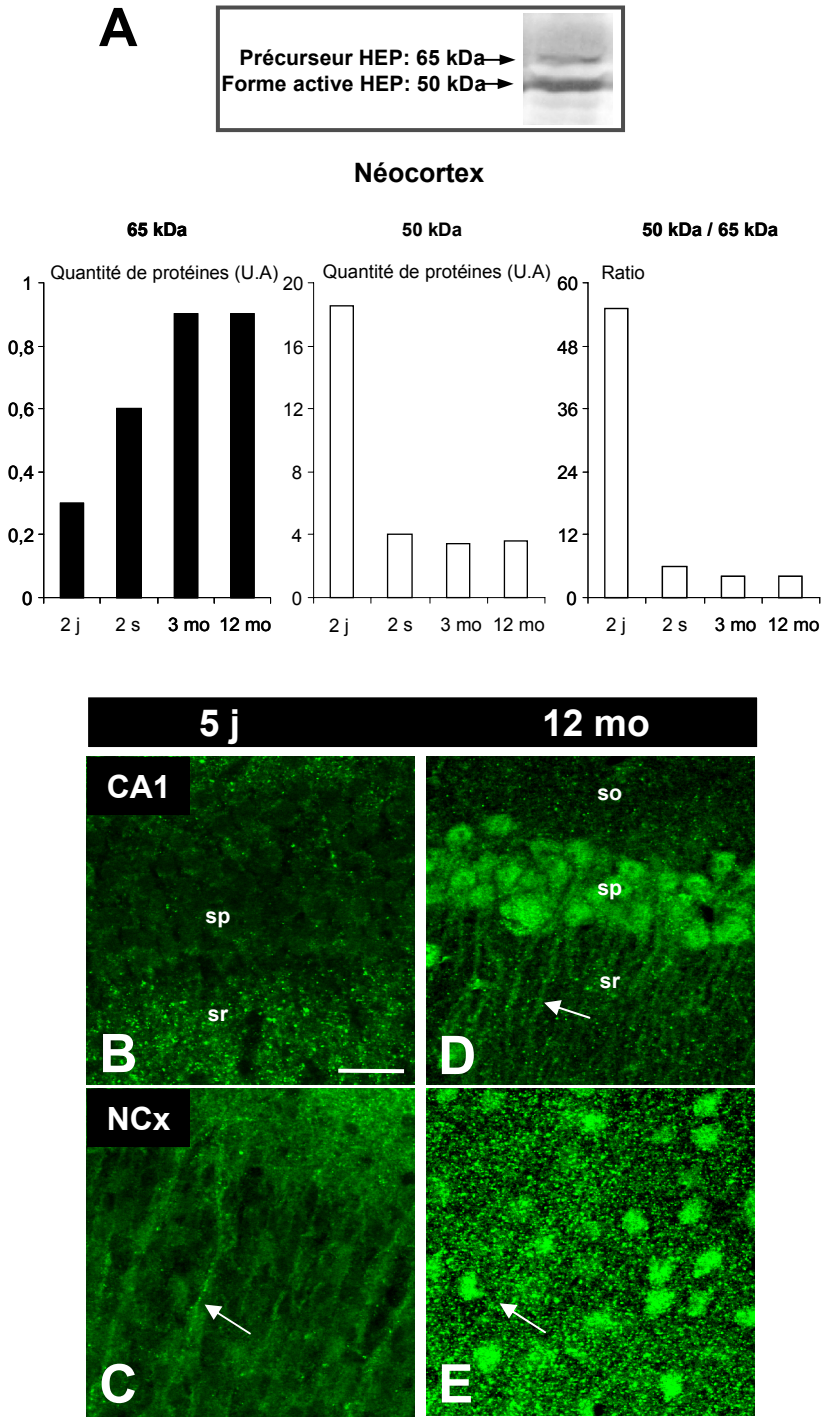


Figure R20 : Quantité de protéines et distribution de l'héparanase dans le cerveau de rat au cours du développement postnatal et du vieillissement

L'immuno-emprunte de l'héparanase est représentée dans le néocortex (**A**). La quantité de protéines de la forme précurseur (65 kDa) et de la forme active (50 kDa) est exprimée en unités arbitraires (U.A). Héparanase immunoréactive dans l'hippocampe au niveau de CA1 (**B**, **D**) et du néocortex (**C**, **E**) au cinquième jour de développement post-natal (**B** et **C**) et au douzième mois (**D** et **E**). L'héparanase immunoréactive est présente dans les prolongements neuronaux dans CA1 (flèche blanche, **D**) et dans le néocortex (flèches blanches, **C** et **E**). Barres de mesure: B, 25 µm.
Abréviations : j, jour; s, semaine; mo, mois; HEP, héparanase; NCx, néocortex; so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*.

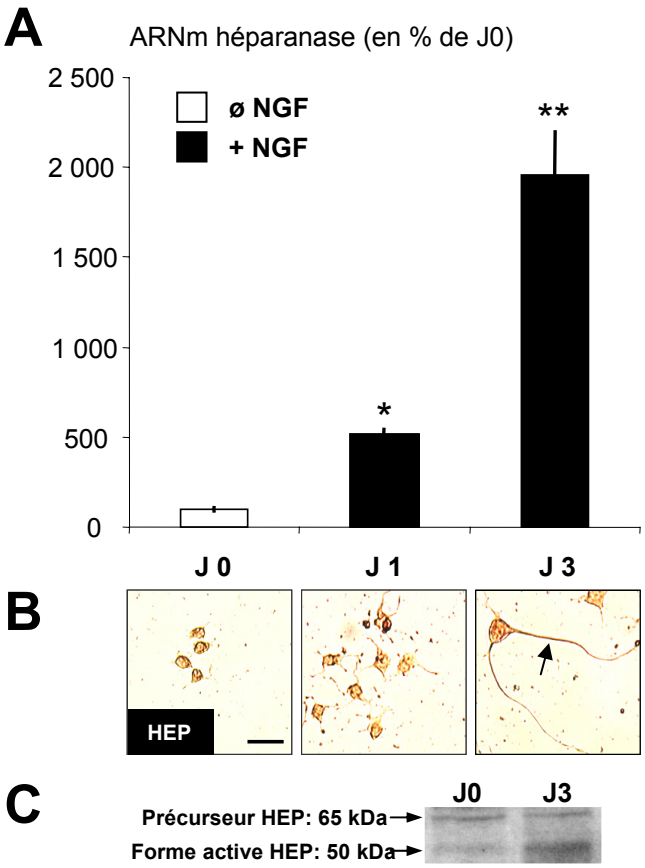


Figure R21 : L'apparition de l'héparanase est corrélée à la neuritogenèse au cours de la différenciation induite par le NGF des cellules PC12.

Taux de l'ARNm de l'héparanase dans des cellules PC12 en culture après traitement par le NGF (**A**). Le nombre de copies d'ADNc a été déterminé par la méthode de RT-PCR étalonnée en temps réel réalisée sur 500 ng d'ARN totaux (voir *Matériels et méthodes*). Les résultats obtenus respectivement 1 jour (J1) et 3 jours (J3) après traitement au NGF sont exprimés en pourcentage ± SEM de la valeur déterminée à jour O (J0), correspondant aux cellules PC12 non traitées au NGF. Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: *, $p<0,05$; **, $p<0,01$, en comparaison de J0. Immunodétection de l'héparanase réalisée sur les cellules PC12 à J0, J1 et J3 (**B**). Les extensions neuritiques des cellules PC12 différenciées après traitement au NGF en cellules de type neuronal contiennent l'héparanase immunoréactive (flèche noire, **B**). L'immuno-emprunte de l'héparanase est illustrée pour les cellules PC12 indifférenciées et les cellules PC12 différenciées par traitement au NGF en cellules de type neuronal (**C**). La forme active de 50 kDa est plus abondante dans les cellules PC12 différenciées en cellules de type neuronal. Barre de mesure : 50 µm.
Abréviations: NGF, facteur de croissance nerveux; HEP, héparanase; j, jour.

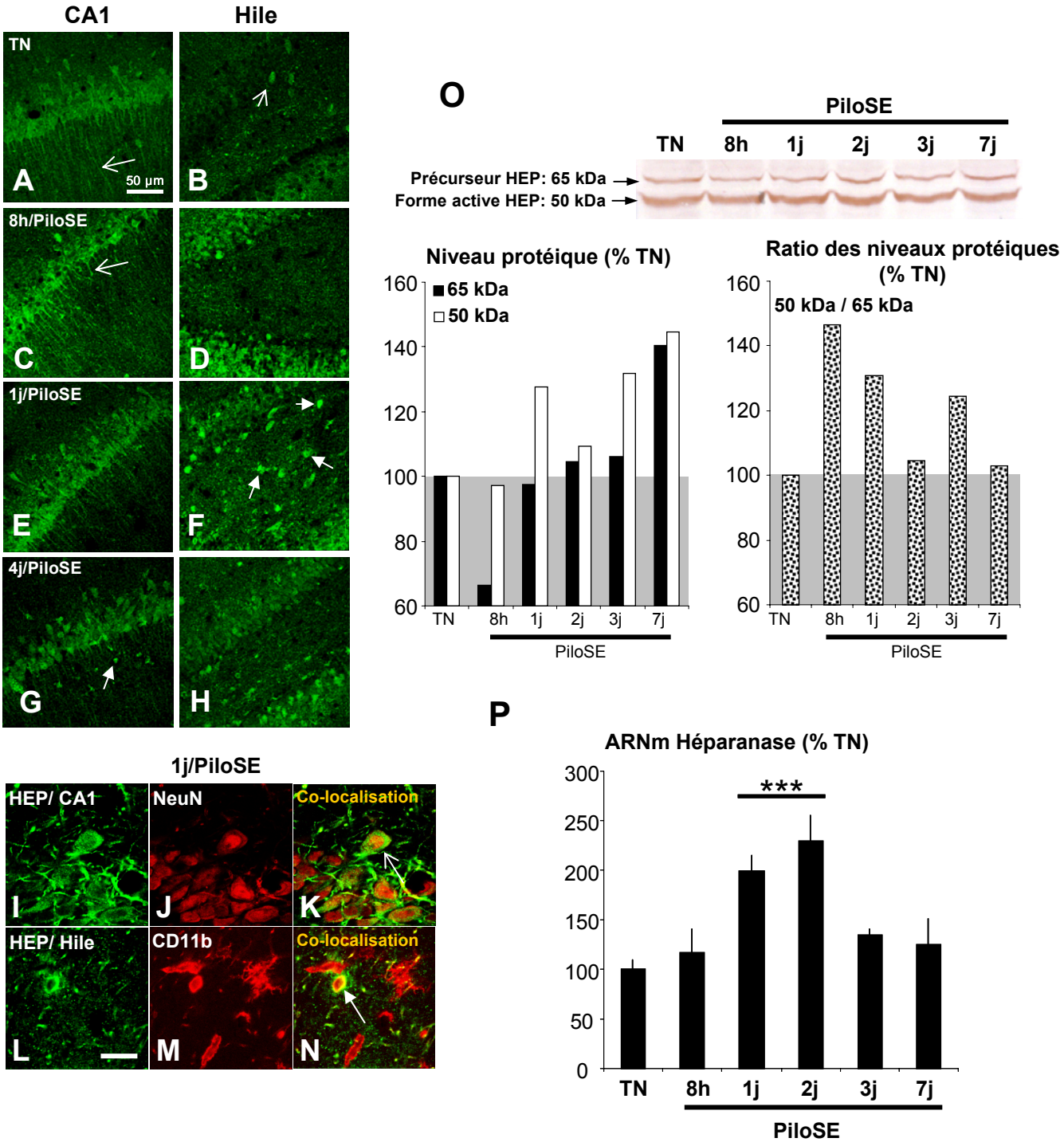


Figure R22 : Quantité et distribution de l'héparanase dans l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine

Barre de mesure : C, 50 µm; N, 25 µm.
Abréviations : TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; HEP, héparanase.

(légende voir page suivante)

Figure R22 : Quantité et distribution de l'héparanase dans l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine

Immunoréactivité de l'héparanase (en vert) dans CA1 (**A**, **C**, **E**, **G**) et dans le hile (**B**, **D**, **F**, **H**) de rats TN (**A** et **B**), et rats 8h/PiloSE (**C** et **D**), 1j/PiloSE (**E** et **F**) et 4j/PiloSE (**G** et **H**). L'héparanase est présente dans les prolongements des cellules principales de la région CA1 (tête de flèche vide, **A** et **C**). Dans le hile, quelques cellules sont marquées chez les rats TN, alors qu'en revanche, de nombreuses cellules rondes apparaissent marquées 1 jour après *SE* (Têtes de flèche pleine, **F**). Des cellules rondes marquées sont également observées dans le *stratum radiatum* de CA1 4 jours après *SE* (Tête de flèche pleine, **G**). Cellules HEP positives (**I**) et NeuN-positives (NeuN, marqueur de neurones) (**J**) dans CA1, et cellules HEP positives (**L**) et CD11b-positives (CD11b, marqueur de cellules immunocompétentes) (**M**) dans le hile 1 jour après *SE*. Un jour après *SE*, certains neurones contiennent l'héparanase dans CA1 (Tête de flèche vide, **K**), alors que dans le hile, ce sont les cellules rondes CD11b positives qui contiennent l'héparanase (Tête de flèche pleine, **N**). L'immuno-emprunte de l'héparanase est représentée dans l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine (**O**). Les formes précurseur (65 kDa) et active (50 kDa) sont indiquées et les quantités de protéines à la suite du *SE* sont illustrées en bas de la figure et indiquées en unités arbitraires (U.A). Taux de l'ARNm de l'héparanase dans l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine (**P**). Les nombres de copies sont déterminés par la méthode de RT-PCR étalonnée en temps réel et réalisée sur 500 ng d'ARN totaux (voir *Matériels et méthodes*). Les résultats sont exprimés en pourcentage ± sem de la valeur déterminée chez les rats TN. Test statistique ANOVA I suivie d'un test Fisher LSD: ***, $p<0,001$ par comparaison avec des rats TN. Barres de mesure : C, 50 µm; N, 25 µm.

Abréviations : TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; HEP, héparanase.

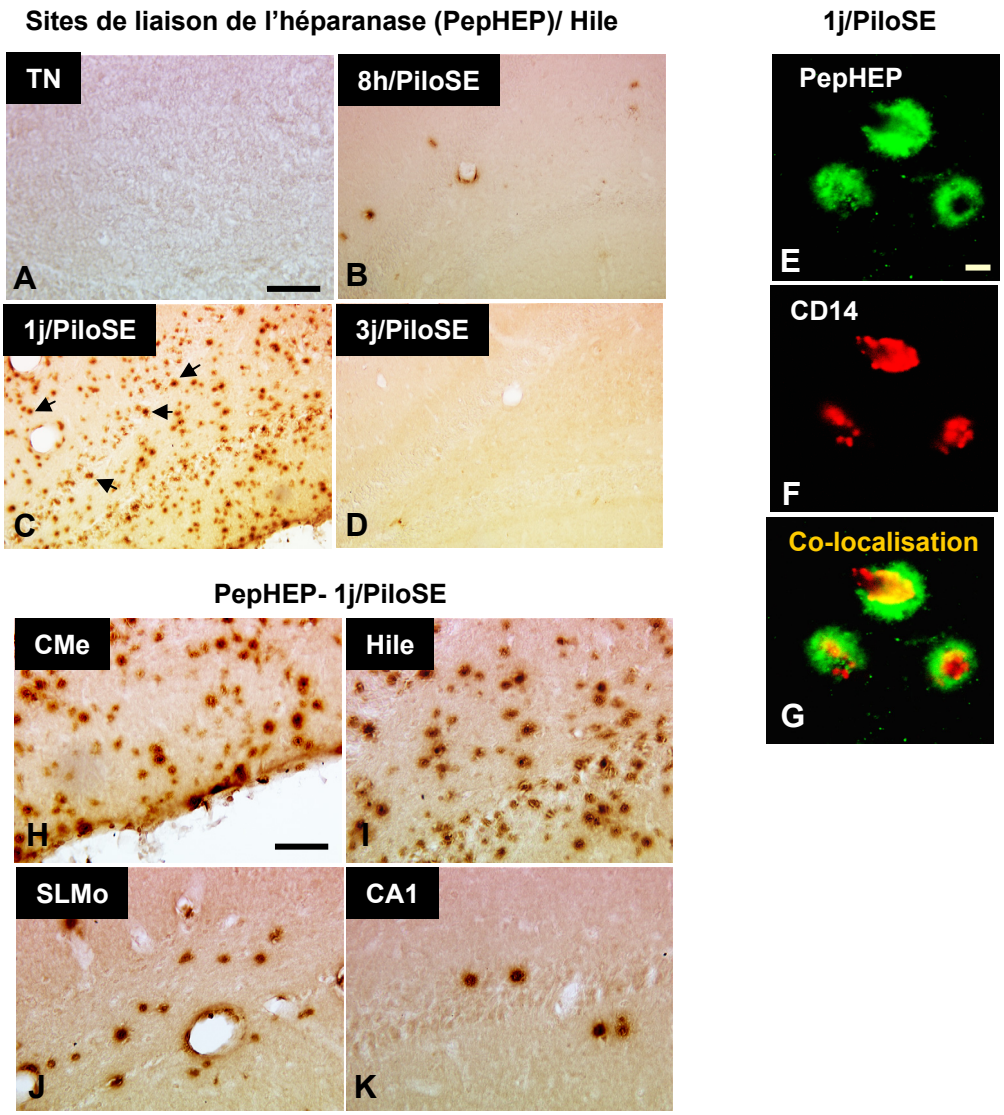


Figure R23 : Distribution des sites de liaison de l'héparanase dans l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine

Cellules liant le peptide de l'héparanase (PepHEP), dont la séquence correspond au domaine de liaison de l'héparanase aux chaînes d'HS (voir *Matériels et méthodes*), sur des coupes de cerveau de rats TN (**A**), de rats 8h/PiloSE (**B**), 1j/PiloSE (**C**) et 3j/PiloSE (**D**). Un jour après *SE*, de nombreuses cellules rondes apparaissent marquées dans le hile, dans la couche moléculaire du GD et le *SLMo* (Têtes de flèche pleine, **C**). Les cellules marquées par le PepHEP (**E**, en vert) sont des cellules rondes CD14 positives (CD14, marqueur de monocytes) (**F**, en rouge) (**G**, co-localisation). A plus fort grossissement, on observe de nombreuses cellules rondes marquées dans la bordure leptoméningeale de la couche moléculaire du GD (**H**), dans le hile (**I**), dans le *SLMo* (**J**), et seulement quelques cellules au niveau de CA1 (**K**). Barres de mesure : A, 50 µm; D, 100 µm; H, 50 µm; L, 10 µm.
Abréviations : TN, témoins naïfs; PiloSE, *Status Epilepticus* induit par la pilocarpine; HS, sulfate d'héparane; HEP, héparanase; PepHEP, peptide immunogène correspondant à la séquence du domaine de liaison de l'héparanase aux chaînes de sulfate d'héparane; CMe, couche moléculaire externe; SLMo, *stratum lacunosum moleculare*.

IV.D. SYNTHESE ET ELEMENTS DE DISCUSSION

IV.D.1. Présence de l'héparanase dans les neurones du cerveau de rat

Cette étude démontre que l'héparanase est présente dans les neurones du cerveau au cours de la vie. Nous avons montré que le taux d'ARNm de l'héparanase est augmenté dans des conditions associées à un remodelage structural intensif, comme celui s'opérant dans le cerveau au cours du développement post-natal.

Caractérisation de la production de l'héparanase dans le cerveau à l'état basal : Bien que l'ARNm de l'héparanase ait été récemment détecté dans les neurones et les astrocytes de la moelle épinière de rats adultes [335], notre étude démontre que l'héparanase est également détectée dans le cerveau antérieur de rats, où elle apparaît exclusivement produite par les neurones dans les conditions physiologiques. Nous n'avons pas observé d'héparanase dans les astrocytes *in vivo*, qui synthétisent pourtant cette enzyme en culture [165]. Dans la moelle épinière, la synthèse par les astrocytes de l'héparanase s'observe essentiellement dans la matière blanche [335]. Dans le cerveau, il est possible que la production d'héparanase soit restreinte aux neurones dans les conditions physiologiques et qu'elle puisse s'étendre à d'autres catégories de cellules comme les astrocytes dans des conditions physio-pathologiques, comme le suggèrent les études réalisées *in vitro* concernant l'invasion de cellules de mélanome dans le parenchyme cérébral [165]. Il est toutefois surprenant que, dans l'étude réalisée sur le cortex pariétal, le transcrit de l'héparanase ne soit pas détecté par RT-PCR pas plus que n'est mis en évidence la protéine par immunohistochimie. [280].

Implication potentielle de l'héparanase cérébrale dans les remaniements structuraux physiologiques : Nos études mettent clairement en évidence que la quantité d'ARNm de l'héparanase dans une région cérébrale est corrélée à la présence de remaniements morphologiques dans cette région. C'est en effet dans l'hippocampe, le néocortex et le bulbe olfactif, où ils persistent à l'âge adulte, que nous avons mesuré les concentrations tissulaires d'ARnm d'héparanase les plus élévées à l'âge adulte. C'est toutefois au cours du développement que les mouvements cellulaires sont les plus importants au sein du SNC, qu'il s'agisse des migrations cellulaires (neurones, astrocytes, cellules microgliales et cellules endothéliales) et de la mise en place des connexions intercellulaires grâce à des prolongements cellulaires qui doivent se frayer un chemin dans le parenchyme cérébral. Des études antérieures avaient suggéré que l'héparanase pouvait jouer un rôle important dans l'organisation architecturale du SNC [93], et au cours de la différenciation neuronale [180].

Nos résultats viennent conforter cette possibilité, puisque nous avons observé que : 1) l'héparanase était présente dans de nombreuses varicosités neuronales dans le cerveau antérieur au cours de la première période du développement post-natal, et 2) que l'expression de son gène était fortement activée au cours de la différenciation neuronale des cellules de la lignée PC12.

Il a été mis en évidence que les deux formes de l'héparanase, la forme zymogène (65 kDa) et la forme active (50 kDa), pouvaient exercer des effets biologiques [94,273]. Au cours du développement, il semblerait que la forme active soit responsable de la plupart des effets qui impliqueraient l'héparanase. En effet, nous avons observé que la forme de 50 kDa est en quantité très importante au cours des premiers jours de la vie post-natale et au cours de la différenciation neuronale des cellules PC12. Cette augmentation pourrait contribuer à intensifier le taux de renouvellement des chaînes d'HS, en complément des modifications de la production des enzymes qui interviennent soit dans leur synthèse, soit dans leur maturation. En effet, la synthèse des chaînes d'HS est gouvernée principalement par : 1) la HS polymérase (principalement EXT-2) (voir paragraphe III.A.3 de l'historique scientifique) et par 2) des épimérases et des sulfotransférases (voir paragraphe III.A.3 de l'historique scientifique) qui régissent les modifications séquentielles des chaînes d'HS [217]. Des taux importants d'ARNm de ces différentes enzymes de biosynthèse des chaînes d'HS ont été détectés dans le cerveau antérieur de souris au cours de la première semaine de vie post-natale [124,324]. Une augmentation du taux de renouvellement des chaînes d'HS aurait des repercussions fortes sur les processus cellulaires (mort neuronale, migration neuronale, axogenèse, dendritogenèse, synaptogenèse, etc…) qui s'opère lors de l'élaboration des circuits neuronaux au cours du développement. Ces processus nécessitent que la biodisponibilité des signaux moléculaires, notamment des molécules morphogènes, soit augmentée. Parmi ces molécules on compte, en particulier, les membres des familles *Hedgehog*, *Wingless* et le FGF [31,234], dont les voies de signalisation sont modulées par leur liaison à des chaînes d'HS [157,158,204,230,329].

IV.D.2. Distribution de l'héparanase dans l'hippocampe à la suite du *status epilepticus*

Une augmentation de la quantité d'héparanase a très récemment été mise en évidence à la suite d'une ischémie cérébrale chez le rat, affectant essentiellement la forme zymogène (65 kDa). En outre, cette augmentation ne concernerait que la population des astrocytes, l'héparanase n'étant quasiment pas détectée dans le cerveau dans cette étude [280]. Notre étude est la seconde à étudier les variations de quantité d'héparanase en conditions physiopathologiques. En particulier, nos résultats indiquent que le taux d'ARNm de

l'héparanase est augmenté dans l'hippocampe à la suite du *SE* induit par la pilocarpine. Ce sont essentiellement les neurones de l'hippocampe et, transitoirement, les cellules infiltrantes qui produiraient le tissu cette enzyme. Nous avons mis en évidence deux périodes au cours desquelles la concentration tissulaire de la forme active est augmentée. Nous avons associé ces deux périodes à deux événements développés ci-dessous.

Infiltration précoce de monocytes/macrophages dans le parenchyme : nous avons observé que les neurones de l'hippocampe sur-produisent l'héparanase dès 8 h après *SE*, et qu'un jour après *SE*, de nombreuses cellules immunocompétentes qui synthétisent également cette enzyme sont présentes dans le parenchyme de l'hippocampe. Ces dernières présentent à leur surface les chaînes d'HS susceptibles de lier l'héparanase. Il est surprenant que les chaînes d'HS susceptibles de lier l'héparanase ne soient détectées qu'au niveau des cellules infiltrantes et nulle part ailleurs dans le tissu, alors que les chaînes d'HS sont retouvées en abondance dans l'hippocampe à l'âge adulte [167]. Ceci suggère que notre méthode de détection ne permet de visualiser que les chaînes d'HS présentant une très forte affinité pour l'héparanase et qu'une affinité de liaison plus modérée de l'héparanase aux chaînes d'HS est vraisemblablement suffisante pour assurer leur renouvellement tissulaire. Les chaînes d'HS détectées sont déjà abondamment présentes à la surface des leucocytes qui sont en cours de diapédèse [209]. Cela pourrait donc signifier que les sites de liaison à haute affinité de l'héparanase auraient facilité l'adhérence des cellules infiltrantes. Ces cellules qui produisent de l'héparanase, la libéreraient alors sous forme active afin de faciliter leur pénétration dans le parenchyme cérébral, en dégradant les chaînes d'HS de la membrane basale en premier lieu et, ensuite celles de la MEC. Que les chaînes d'HS soient particulièrement abondantes autour des cellules infiltrantes 1 jour après *SE* pourrait être un indicateur de différenciation. En effet, la différenciation des monocytes en macrophages serait associée à une augmentation à leur surface de certains HSPG [209].

Puisque la séquence peptidique permettant de détecter les chaînes d'HS correspond au site de liaison de haute affinité de l'héparanase par les chaînes d'HS, il se pourrait donc que l'héparanase sécrétée par les cellules invasives elles-mêmes soit présentée à leur surface par la liaison à la « couronne » d'HS. Des études antérieures indiquent que la présence de l'héparanase à la surface cellulaire augmente considérablement les capacités invasives des cellules qui la secrètent [82,93] (voir paragraphe IV.B de l'historique scientifique). Ces éléments suggèrent bien que les cellules infiltrantes sont hautement invasives.

De plus, les cellules stromales cerveau pourrait renforcer l'infiltration de cellules invasives par la sur-production d'une héparanase active [165]. Nous pouvons envisager ce même type de coopération cellulaire à la suite du *SE* induit par la pilocarpine, puisque les

neurones sur-produisent l'héparanase dès 8 h après le *SE*. En outre, il a été précédemment montré que la biosynthèse des chaînes d'HS est transitoirement diminuée dans l'hippocampe 6 h après un *SE* induit par la pilocarpine [185], ce qui suggère que l'hippocampe coordonne les processus de régulation des chaînes d'HS pour diminuer leur taux extracellulaire et faciliter ainsi les phénomènes de migration cellulaire. En effet, quand les chaînes d'HS diminuent dans le compartiment extracellulaire, les contraintes mécaniques diminuent d'une part, et les facteurs chimiotactiques et les morphogènes sont plus facilement disponibles d'autre part (voir paragraphe III.B. de l'historique scientifique).

Les chaînes d'HS qui présentent une forte affinité pour l'héparanase ont complétement disparu dès le troisième jour après le *SE*. C'est donc au cours de leur migration qu'elles ont perdu ces chaînes, vraisemblablement sous l'action simultanée de l'héparanase qu'elles sécrètent elles-mêmes, et de l'héparanase produite par les neurones qu'elles rencontrent. Il se pourrait notamment que la synthèse neuronale participe au modelage morphologique qu'arboreront ces cellules à la fin du processus de différenciation. En effet, nous avons vu, que dans le CA1, l'héparanase est acheminée vers les dendrites apicales des neurones pyramidaux. Ces dendrites forment des rayons à travers le *stratum radiatum*, orientés du *stratum pyramidalis* au *SLMo*. C'est précisément la même orientation que montrent les cellules microgliales qui demeurent fortement activées en fin d'épileptogenèse, et dont nous pensons qu'elles proviennent de la différenciation des monocytes ayant envahi le parenchyme cérébral. L'adoption d'une forme parallèle à celle des dendrites des neurones de CA1 aurait donc pu être facilitée par l'héparanase, qui peut jouer le rôle de molécule d'adhérence aussi bien sous sa forme zymogène qu'active [87,94,120,273].

Sur-production maintenue de l'héparanase par les neurones survivants : Nous avons observé que la concentration tissulaire de la forme active était de nouveau augmentée à partir du troisième jour à la suite du *SE* et que l'héparanase est essentiellement contenue dans les neurones au cours de cette période. La quantité d'ARNm de l'héparanase revient au niveau de base au cours de cette période alors que de nombreux neurones ont dégénéré, notamment dans le hile. Ces éléments indiquent que les neurones survivants sur-produisent l'héparanase bien que l'infiltration tissulaire des monocytes/macrophages ne soit pas maintenue.

La sur-production de l'héparanase par les neurones survivants pourrait venir moduler de nombreuses voies de signalisation. En effet, comme vu précédemment (paragraphe III.B.2.b de l'historique scientifique), les chaînes d'HS présentes à la surface de la cellule pourraient potentialiser les voies de signalisation de nombreux facteurs [24]. La sur-production de l'héparanase par les neurones survivants pourrait alors, par la dégradation des chaînes d'HS de surface, « insensibiliser » au moins partiellement ces neurones aux facteurs

de l'environnement, dont certains pourraient s'avérer toxiques. Si cette sur-production était suivie d'une sécrétion, elle permettrait par la dégradation des chaînes d'HS extracellulaires une plus grande libération de facteurs. Ces derniers exerceraient alors leurs effets biologiques (voir paragraphe III.B.2 de l'historique scientifique). Parmi les facteurs piègés par les chaînes d'HS extracellulaires, on trouve les neurotrophines. La sur-production de l'héparanase par les neurones survivants augmenterait localement la biodisponibilité des facteurs trophiques.

Enfin, les fragments libérés par la dégradation des chaînes d'HS pourraient jouer un rôle dans la mise en place de connections abbérantes, impliquant de ce fait l'héparanase dans la ré-organisation structurale de l'hippocampe à la suite du *SE* notamment lors de l'axogenèse réverberrante des fibres moussues. En effet, il a montré sur des embryons de cafards en culture que l'administration de chaînes d'HS provoque des abbérations dans le cheminement des axones de Til, qui représente la première pousse axonale du système nerveux périphérique de cafard [326]. Un traitement à base d'héparitinase dans les cellules en culture donne des résultats similaires [326].

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail visait à caractériser la réponse inflammatoire de l'hippocampe à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine. Nous avons en particulier recherché si cette réponse comprenait une composante « périphérique » c'est-à-dire, une infiltration par les monocytes/macrophages.

Au regard de l'ensemble de nos résultats expérimentaux, nous avons distingué deux phases successives de la réaction inflammatoire :

- d'abord une phase aiguë associée à la réactivité des cellules microgliales résidentes, à l'infiltration massive de monocytes/macrophages et à la forte production de cytokines pro-inflammatoires,
- puis, une phase « chronique » associée au maintien de la réactivité des cellules microgliales dans les zones de dégénérescence et au retour à un niveau de base de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires.

I. Phase aiguë de l'inflammation de l'hippocampe à la suite du *SE*

Nos résultats expérimentaux révèlent que la microglie résidente s'active rapidement dans l'ensemble de l'hippocampe dès 8 h après *SE*. Dans la partie ventrale de l'hippocampe, les cellules activées de la microglie produisent la cytokine pro-inflammatoire IL-1β, qui pourrait amorcer la mise en place de la dégénérescence des neurones du voisinage. En outre, nous avons démontré clairement sur la base de critères morphologiques et phénotypiques que de nombreux monocytes/macrophages ont infiltré le parenchyme de l'hippocampe entre 8 h et 1 jour après *SE*. Ces cellules infiltrantes ont été attirées par des signaux émis rapidement par l'hippocampe. Nous avons en effet mis en évidence pour la première fois une augmentation des taux d'ARNm des chimiokines MCP-1, MIP-1α et MIP-1β dans l'hippocampe dès 8 h après *SE*. De plus, nos résultats suggèrent une coopération intercellulaire originale qui faciliterait la progression des cellules infiltrantes jusqu'au parenchyme. Cette coopération est basée sur une sur-production de la forme active de l'héparanase à la fois par les cellules infiltrantes et par les neurones. Il semblerait que cette coopération soit poussée de telle sorte que l'héparanase libérée par les dendrites des neurones pyramidaux de CA1 puisse moduler la morphologie des cellules de la microglie localisées dans le *stratum radiatum*. Nos résultats expérimentaux sont les premiers à mettre en évidence non seulement la production

d'héparanase par les neurones dans l'hippocampe, mais aussi une augmentation de l'héparanase produite à la suite d'un *SE*. Une fois dans le parenchyme de l'hippocampe, les cellules infiltrantes sont la principale source de l'IL-1β, mais également celle d'autres cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF-α et l'IL-6. Il se pourrait, compte tenu du rôle toxique clairement reconnu des cytokines pro-inflammatoires, que la forte production de ces cytokines 1 jour après *SE* provoque la mort de neurones du hile. Ces neurones sont inscrits dans le circuit de rétrocontrôle négatif de l'excitabilité des neurones granulaires, ce qui suggère de ce fait que les processus inflammatoires, en contribuant à la mort des neurones du hile, pourraient être impliqués dans la transformation épileptique de l'hippocampe.

Par ailleurs, nous avons observé que les astrocytes étaient préservés, puis s'activaient en produisant de l'IL-1β dans le hile lorsque ces cellules infiltrantes étaient moins abondantes. Ceci suggère que les cellules infiltrantes sont délètères pour les astrocytes et que ces dernières peuvent, dans certaines conditions, être le relai de la réaction inflammatoire.

II. Phase « chronique » de l'inflammation de l'hippocampe à la suite du *SE*

Plusieurs de nos résultats concordent et nous révèlent l'absence de cellules infiltrantes dès 3 jours après *SE*, ce qui démontre que l'infiltration des monocytes/macrophages n'est pas soutenue dans l'hippocampe à la suite du *SE*. Différents scénarios sont alors possibles pour expliquer cette absence : 1) les cellules infiltrantes ont quitté l'hippocampe, 2) elles sont restées mais ce sont différenciées en un autre type cellulaire ce qui a entraîné une modification profonde de leur forme et de leur phénotype, et enfin 3) une combinaison de ces deux processus. Si les cellules immunocompétentes quittent le parenchyme après y être entré, ce serait pour jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène et recruter des lymphocytes. Une étude précédente révèle que les marqueurs de lymphocytes ne sont pas détectés dans l'hippocampe à la suite du *SE* induit par la pilocarpine [293] ou par l'acide kaïnique [60], ce qui indique que la réponse inflammatoire de l'hippocampe à la suite du *SE* est restreinte à l'immunité innée et ne s'étend pas à l'immunité adaptative. Par ailleurs, nous avons observé que le maintien de la cicatrice « microgliale » dans le hile est amoindri à la suite d'un traitement par l'indométhacine, dont nous avons montré qu'il atténue fortement l'infiltration par les monocytes. L'ensemble de ces éléments suggère que les cellules infiltrantes seraient différenciées en cellules de type microglial, et seraient responsables de la cicatrice « microgliale » persistante observée à 15 jours dans le hile. L'activation des cellules microgliales résidentes ne serait alors pas maintenue dans l'hippocampe à la suite du *SE*. Nous pouvons alors envisager que les cellules de type microglial dérivées des cellules

infiltrantes ne seraient pas capables à l'âge adulte d'adopter une morphologie de type « quiescent » similaire à celle des cellules microgliales résidentes.

Cette dernière observation peut être interprêtée de deux manières différentes :

1) soit les « nouvelles » cellules microgliales sont « bloquées » dans un état de différenciation morphologique irréversible. Si tel était le cas, le maintien d'un état activé par ces cellules ne serait pas associé à une fonction toxique, car les phénomènes de dégénérescence sont réduits 15 j après le *SE* et que le taux des cytokines pro-inflammatoires est revenu, en fin d'épileptogenèse, à celui mesuré dans les conditions de base.

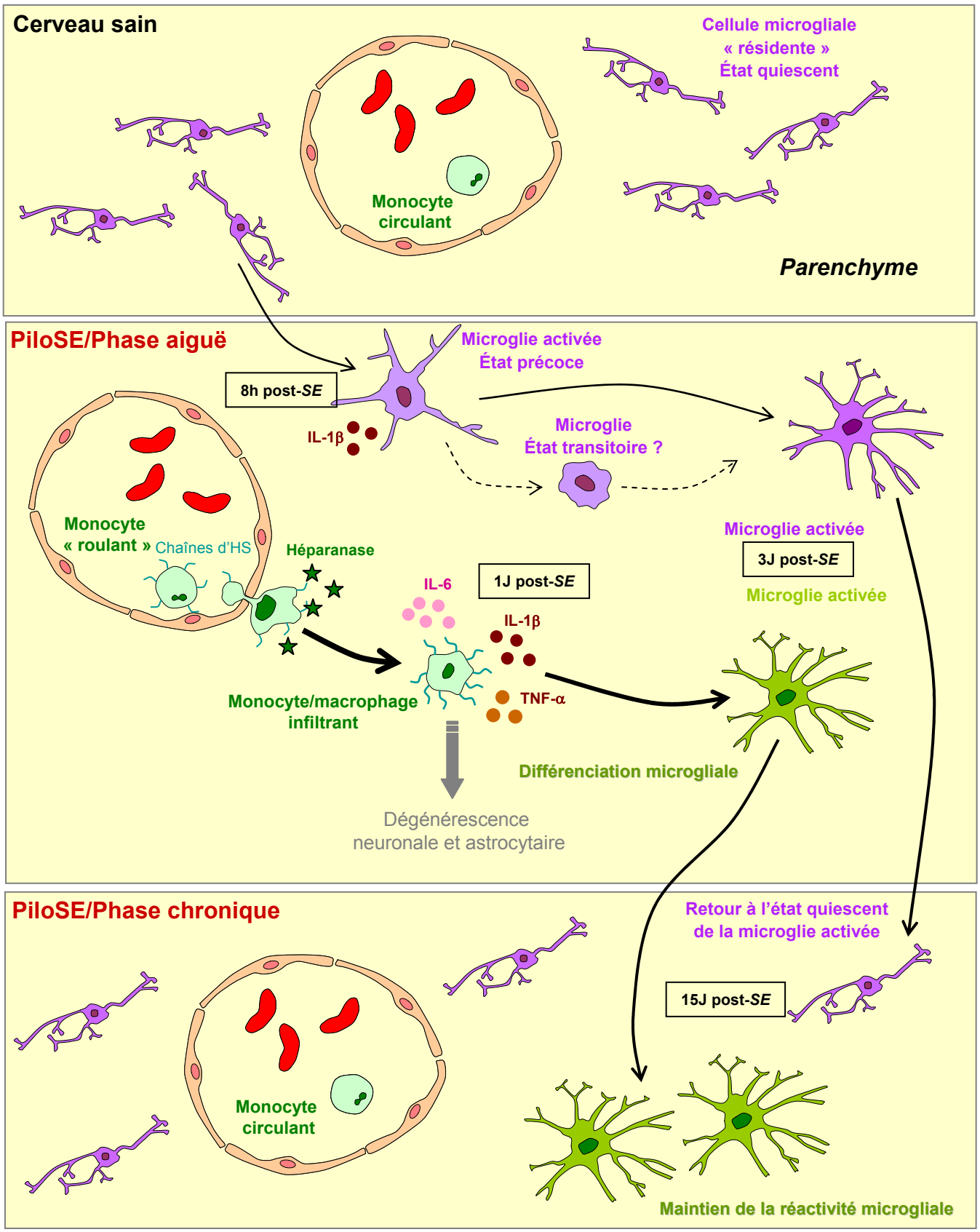
2) soit ces cellules assurent sur le long terme des fonctions autres que celles généralement décrites pour les cellules microgliales résidentes. Il pourrait être envisagé, compte tenu de la régression globale des processus de neurodégénérescence en fin d'épileptogenèse, que ces cellules soutiennent la survie neuronale par la production de facteurs trophiques. Ainsi, même si ces cellules ont pu contribuer à l'exacerbation de la réponse inflammatoire cérébrale, parce qu'elles auraient apporté avec elles des quantités importantes de cytokines pro-inflammatoires, elles auraient changé de statut sur le long terme pour venir soutenir la survie des neurones restants. Dans ce contexte, l'infiltration précoce de nombreux monocytes/macrophages pourrait être considérée comme « ***un mal pour un bien*** ».

En fin de compte, ces cellules sont-elles délétères ou bénéfiques pour le cerveau dans les conditions physio-pathologiques ? Vraisemblablement elles assurent les deux fonctions (toxiques et trophiques), selon le temps auquel on se situe. Reste alors à déterminer ce que serait le devenir du tissu cérébral si l'on empêchait ces cellules d'entrer dans le parenchyme à la suite d'une lésion du cerveau.

En conclusion, nous proposons un schéma qui caractérise la réponse inflammatoire au cours de l'épileptogenèse induite par la pilocarpine (***Figure C1****, page suivante*). Ces observations sont à étendre à d'autres types d'épileptogenèse pour déterminer si une infiltration massive des monocytes/macrophages est un processus incontournable dans la transformation épileptique de l'hippocampe. Ce travail indique que, lorsque le *SE* est induit par la pilocarpine, la réaction inflammatoire pour l'essentiel s'opère précocément au cours de l'épileptogenèse et n'est pas réactivée au cours des crises récurrentes. Les processus inflammatoires seraient impliqués dans les réorganisations structurales de l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse et non dans la survenue des crises sur le long terme (ictogenèse).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Figure C1



PERSPECTIVES

Les perspectives qui découlent de ce travail concernent le rôle que pourrait jouer la réponse inflammatoire de l'hippocampe dans les ré-organisations structurales qui y siègent à la suite d'un *SE* induit par la pilocarpine. En particulier, il est essentiel de comprendre l'influence qu'exerce la composante « périphérique » de cette réponse, à savoir les cellules infiltrantes, sur la dégénérescence des populations neurales et/ou à plus long terme sur la régénérescence tissulaire. Pour ce faire, plusieurs approches peuvent être envisagées et sont énoncées ci-dessous.

I. Blocage de l'infiltration des cellules immunocompétentes « périphériques »

Nous avons montré dans ce travail que l'indométhacine ne permettait qu'une limitation partielle du phénomène d'infiltration de monocytes/macrophages. D'autres stratégies doivent alors être envisagées. Une des stratégies destinée à bloquer l'infiltration des cellules serait de contrecarrer les signaux émis par l'hippocampe qui les attirent. En particulier, nous avons montré qu'une augmentation du taux des chimiokines précédait l'infiltration par les monocytes/macrophages. Si cette augmentation est suivie de celle de la synthèse protéique, ces chimiokines pourraient attirer les cellules infiltrantes. En effet, MCP-1, par exemple, exercerait un puissant chimiotactisme positif sur les monocytes [21]. Une étude récente indique que MCP-1 nécessite une maturation protéolytique par la plasmine pour être actif [262]. La plasmine est une protéase elle-même activée par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Ainsi, la stratégie qui consiste à bloquer localement la maturation protéolytique de la plasmine pourrait s'avérer efficace pour inhiber le chimiotactisme réactionnel de l'hippocampe. Pour ce faire, il faudrait inhiber localement l'activité enzymatique du tPA au cours des premiers jours qui suivent le *SE*. La neuroserpine est un candidat potentiel, clairement reconnu pour inhiber l'activité tissulaire du tPA [330]. Elle est principalement produite par les neurones et les astrocytes dans le cerveau et sa synthèse est induite dans les zones lésées à la suite d'une ischémie cérébrale [330].Toutefois, cette sur-production n'est pas suffisante pour bloquer la cascade des signaux cellulaires qui conduise à la dégénérescence neuronale, mais son administration réduit considérablement le volume lésionnel induit, soit par l'ischémie [330], soit par l'administration de l'agent excitotoxique NMDA [151]. Ses effets protecteurs seraient associés à la réduction de l'influx de calcium provoqué par l'activation du récepteur NMDA [151].

Une autre stratégie consisterait à masquer dans l'endothélium, les molécules d'adhérence qui permettent le roulement et/ou l'ancrage des cellules immunocompétentes circulantes. ICAM-1, molécule d'adhérence synthétisée par l'endothélium capillaire dans un contexte inflammatoire et reconnue par les intrégrines des leucocytes, constituerait une bonne cible. Toutefois, cette stratégie de « masquage » ne serait réellement efficace qui si les monocytes/macrophages observés dans l'hippocampique provenait des monocytes circulants. En effet, si, à l'inverse, la majorité des cellules infiltrantes etait issue des leptoméninges, cette stratégie de « masquage » ne présenterait qu'une efficacité très limitée pour bloquer l'infiltration par les monocytes. Il faudrait alors déterminer le chemin d'accès principal des monocytes/macrophages jusqu'au parenchyme de l'hippocampe. (*Nous avons tenté de répondre à cette question par des études préliminaires en utilisant des microparticules supraparamagnétiques d'oxyde de fer (USPIO) qui, en culture, sont capturées par les monocytes. Ces microparticules sont à la fois détectables par imagerie médicale et par une technique de coloration histologique. Nous avons injecté par voie intraveineuse les USPIO à la suite du SE induit par la pilocarpine dans la fenêtre de temps qui correspond à l'infiltration des cellules. Les résultats de la coloration histologique réalisés sur les cerveaux perfusés indiquent que très peu de cellules contenant des USPIO sont détectables dans l'hippocampe 1 jour après SE. En revanche, nous avons observé de nombreuses cellules marquées dans la rate, un organe lymphoïde secondaire, ce qui indique que de nombreux monocytes ont bien capturé les USPIO injectés. Ce dernier résultat nous a alerté sur la possibilité que les monocytes aient pu rejoindre la rate après avoir capturés les USPIO, les rendant indisponibles pour « coloniser » l'hippocampe à la suite du SE, et ne nous permet pas de conclure que les cellules infiltrantes proviennent des leptoméninges. Le développement d'autres sondes moléculaires, ne modifiant pas le comportement physiologique des cellules de l'immunité est alors nécessaire pour aborder la problématique du chemin d'accès).*

Enfin, la dernière stratégie que nous envisageons consisterait à bloquer les sites de fixation de l'héparanase sur les chaînes d'HS portées par les leucocytes circulants. Cette stratégie est déjà en cours de développement, et s'appuie sur la séquence peptidique utilisée pour la détection des chaînes d'HS à haute affinité pour l'héparanase. Cette séquence peptidique, injectée par voie i.v. à l'issue du *SE*, devrait se lier aux chaînes d'HS des leucocytes circulants et perturber leur roulement, et/ou leur ancrage à l'endothélium des capillaires, puisque l'héparanase interviendrait favorablement dans le bon déroulement de ces processus [94,209,273]. Si ces leucocytes parvenaient à entrer dans le parenchyme de l'hippocampe, il se pourrait qu'ils ne puissent pas migrer très loin, en raison du blocage du site de liaison de l'héparanase. En effet, le maintien de la « couronne » en chaînes d'HS de

haute affinité pour l'héparanase pourrait constituer un frein à la motilité de ces cellules à travers la MEC.

II. Modulation de la différenciation toxique des cellules infiltrantes

Nous avons mis en évidence que les cellules infiltrantes consituaient dans l'hippocampe un jour après *SE* la source principale des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α, IL-6), au moment même où dégénèrent les neurones du voisinage. Par ailleurs, dans une étude précédente, nous avons montré que l'administration d'érythropoïétine humaine (rHuEPO) à la suite du *SE* induit par la pilocarpine s'avérait neuroprotecteur pour les cellules moussues [181]. Dans le protocole de traitement, la rHuEPO était injectée un jour après *SE*, au moment où les cellules infiltrantes sont présentes dans le hile. Plusieurs résultats expérimentaux obtenus laissent présager que le traitement par la rHuEPO pourrait avoir des effets directs sur les cellules infiltrantes. En effet, nous avons mis en évidence :1) que les récepteurs de l'EPO sont très présents à la surface des cellules infiltrantes, et 2) que les cellules de la microglie adoptent une morphologie particulière dans le hile 15 jours après *SE* lorsque la rHuEPO est administrée à l'issue de ce *SE*. Cette morphologie correspond à une forme intermédiaire entre la forme quiescente et la forme activée. Il se pourrait alors que l'EPO exogène ait modulé la différenciation des cellules infiltrantes pour les transformer en cellules trophiques. L'approfondissement des mécanismes sous-jacents est actuellement en cours.

III. Inhibition de la réponse inflammatoire au cours du *SE*: bénéfices à long terme sur les capacités cognitives ?

Nos résultats indiquent que le traitement par l'indométhacine a limité l'infiltration des monocytes/macrophages à l'issue du *SE* et a atténué à long terme la cicatrice microgliale dans les zones de lésion. Ces effets sont associés à la prévention de l'atrophie de l'hippocampe. Le lien entre l'infiltration des monocytes/macrophages et le développement de l'atrophie mériterait d'être approfondi. Si des études futures venaient à confirmer la corrélation entre l'infiltration des monocytes/macrophages et le développement d'une atrophie, il faudrait déterminer à plus long terme les bénéfices cognitifs qu'engendrerait un traitement permettant de bloquer l'infiltration.

GLOSSAIRE

aa : *acide aminé*
Ac : *anti-corps*
ADN : *acide désoxyribonucléique*
ADNc : *acide désoxyribonucléique complémentaire*
ADNg : *acide désoxyribonucléique génomique*
AINS : *anti-inflammatoire non stéroïdien*
AIS : *anti-inflammatoire stéroïdien*
ANOVA I : *analyse de variance à 1 facteur*
ANOVA II : *analyse de variance à 2 facteurs*
ARNi : *acide ribonucléique interférent*
ARNm : *acide ribonucléique messager*
ATP : *adénosine tri-phosphate*

BCA : *acide bicinchoninique*
BDNF : *facteur neurotrophique dérivé du cerveau (pour « brain »)*
BHE : *barrière hémato-encéphalique*
BrdU : *5-bromo-2-désoxyuridine*
BSA : *albumine de sérum bovine*

CA : *corne d'Ammon*
CA1 : *région 1 de la corne d'Ammon*
CA2 : *région 2 de la corne d'Ammon*
CA3 : *région 3 de la corne d'Ammon*
CCG : *couche des cellules granulaires*
CCR2: *récepteur de type 2 des chimiokines de la famille CC*
CCR5: *récepteur de type 5 des chimiokines de la famille CC*
CD11b : *marqueur de cellule immuno-compétente (pour « cluster of differentiation 11b »)*
CD14 : *marqueur de cellule myéloïde (pour « cluster of differentiation 14 »)*
CD45 : *marqueur commun à tous les leucocytes (pour « cluster of differentiation 45 »)*
cm : couche moléculaire
CNTF : *facteur neurotrophe ciliaire*
COX : *cyclo-oxygénase*
cs : *collatérale de Schaeffer*
CxP : *cortex piriforme*

DAB : *diaminobenzidine*
DD : *domaine provoquant la mort cellulaire (pour « death »)*
dNTP: *désoxynucléotide tri-phosphate*
DO : *densité optique*
DS : *sulfate de dermatane*

EAE : *encéphalomyélite auto-immune expérimentale*
Egr-1 : *facteur de croissance (pour « growth ») à réponse précoce (pour « early response ») de type 1*
ELISA : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*
EPLT : *épilepsies partielles du lobe temporal*
Epo : *érythropoïétine*
Epo-R : *récepteur de l'érythropoïétine*

ERK : *Kinases à signalisation régulée par le milieu extracellulaire*

Fe : *atome de fer*

FGF : *facteur de croissance (pour « growth ») des fibroblastes*
FGF-1 : *facteur de croissance (pour « growth ») des fibroblastes de type 1*
FGF-2 : *facteur de croissance (pour « growth ») des fibroblastes de type 2*
FGFR1 : *récepteur de type 1 de facteur de croissance (pour « growth ») des fibroblastes*
fm : *fibres moussues*

GABA : *acide gamma-amino butirique*
GAG : *glycosaminoglycane*
GAPDH : *glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase*
GD : *gyrus denté*
GDNF : *facteur neurotrophe dérivé des cellules gliales*
GFAP : *protéine acide fibrillaire d'origine gliale*
GFP : *protéine autofluorescente verte (pour « green »)*
GlcA : *acide glucuronique*
GlcNAc : *N-acétyl glucosamine*
GlcNS : *N-sulfate-D-glucosamine*
GM-CSF : *facteur stimulant les colonies des macrophages-granulocytes*
gp-130 : *glycoprotéine de 130 kDa*
GPI : *glycosyl-phosphatidyl inositol*

HGF : *facteur de croissance (pour « growth ») des hépatocytes*
Hi : *hippocampe*
HS : *sulfate d'héparane*
HSD : *domaine hautement sulfaté*
HSPG : *protéoglycane à sulfate d'héparane*
HST : *HotStar taq polymérase*

IκB : *molécule inhibitrice du facteur de transcription NFκB*
IA : *coordonnées interaurales*
ICE : *enzyme de conversion de l'interleukine-1*
IdoA : *acide iduronique*
IGF : *facteur de croissance (pour « growth ») de l'insuline*
IgG : *immunoglobuline G*
IL-1 : *interleukine-1*
IL-1α : *interleukine-1 α*
IL-1β : *interleukine-1 β*
IL-6 : *interleukine-6*
IL-6R : *récepteur de l'interleukine-6*
IL-1Ra : *antagoniste naturel des récepteurs de l'interleukine-1*
IL-1RacP : *protéine accessoire aurécepteur de type I à l'interleukine-1*
IL-1RI : *récepteur de type I de l'interleukine-1*
IL-1RII : *récepteur de type II de l'interleukine-1*
Indo : *indométhacine*
IRAK : *kinase associée au récepteur de l'interleukine-1*
i.c.v : *voie d'injection intra-cérébroventriculaire*
i.h. : *voie d'injection dans l'hippocampe*
i.p : *voie d'injection intra-péritonéale*
i.v : *voie d'injection intra-veineuse*

J : *jour*
JAK : *janus kinase*
JAK-1 : *janus kinase-1*

JNK: *jun-kinases*

kDa : *kilodalton*
kg : *kilogramme*
KO : *knock out*

log : *logarithmes*
LPS : *lipopolysaccharide*

MAPK : *famille des protéines kinases à activité mitogène*
MCP-1 : *protéine de type 1 du chimiotactisme des monocytes*
ME : *moëlle épinière*
MEC : *matrice extracellulaire*
MIP-1α : *proteine inflammatoire de type 1α des macrophages*
MIP-1β : *proteine inflammatoire de type 1β des macrophages*
mL : *millilitre*
mUI : *milliunités internationales*
mm : *millimètre*
MMP : *métalloprotéinases matricielles*
MT-MMP : *métalloprotéinases de type membranaire*
Mo : *mois*
MP : *méthylprednisolone*

n : *nombre d'animaux par groupe*
NCx : *néocortex*
NDST: *N-dés-acétylase/N-sulfotransférase*
NeuN : *marqueur de neurone (pour « neuronal nuclei »)*
NFκB : *facteur de transcription nucléaire de la chaîne légère κ des lymphocytes B*
ng : *nanogramme*
NGF : *facteur de croissance (pour « growth ») des nerfs*
nM : *nanomolaire*
NMDA : *N-méthyl-D-aspartate*
NR2B : *sous unité de type 2B du récepteur NMDA*

OST : O-sulfo-transférase

P0 : *jour de la naissance des ratons*
PAI : *inhibiteurs des activateurs du plasminogène*
pb : *paire de base*
PB : *tampon (pour « buffer ») phosphate*
PBS : *tampon (pour « buffer ») phosphate salin*
PBS-T : *tampon (pour « buffer ») phosphate salin avec 0,3% de triton x100*
PBS-T-D : *tampon (pour « buffer ») phosphate salin avec 0,3% de triton x100 et 2% de sérum normal d'âne*
PC12 : *lignée cellulaire dérivée de cellules chromaffines surrénaliennes (pour « phéochromocytome »)*
PCR : *réaction de polymérisation en chaine*
PF : *paraformaldéhyde*
PG : *protéoglycane*
PI3K : *phosphoinositide-3-kinase*
Pilo-SE : *status epilepticus induit par l'administration de pilocarpine*
pM : *picomolaire*
PMA : *12-myristate 13-acetate de phorbol*
post-SE : *à la suite (pour « post ») de la période de status epilepticus*
PS : *phosphatidyl-sérine*

RE : *reticulum endoplasmique*

rHuEpo : *érythropoïétine humaine recombinée ou produite par génie génétique*
RK : *kinases de réactivation*
RT-PCR : *réaction de rétro-transcription (ou « transcription inverse ») suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne*

s.c : *voie d'injection sous-cutanée*

SE : *status epilepticus*
sec : *seconde*
SEM : *erreur standard sur la moyenne*
Sg : *stratum granulosum*
SLMo : *stratum lacunosum moleculare*
SNC *système nerveux central*
so : *stratum oriens*
sp : *stratum pyramidalis*
sr: *stratum radiatum*
STAT : *famille des transducteurs de la signalisation et activateurs de la transcription*

TA : *température ambiante*
TACE : *TNF alpha converting enzyme*
TIMP : *Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases*
Tm : *Température de fusion*
TN : *témoins naïfs*
TNF-α : *facteur de nécrose tumorale α*
TNF-β : *facteur de nécrose tumorale β*
TNF-RI : *récepteur de type I de facteur de nécrose tumorale*
TNF-RII : *récepteur de type II de facteur de nécrose tumorale*
tPA : *activateur tissulaire du plasminogène*
TRAF : *TNF receptor associated factor*

U : *unité*
UI : *unité internationale*
UMD : *domaine sulfaté non modifié pour (unmodified)*
UP : *eau ultra pure*
uPA : *Activateur « urokinase » du plasminogène*
USPIO : *microparticules (pour « ultrasmall ») supraparamagnétiques d'oxyde de fer (pour « iron »)*
UV : *ultraviolets*

VEGF : *facteur de croissance (pour « growth ») des cellules endothéliales vasculaires*
VP : *voie perforante*

ZSG : *zone sous granulaire*

µg : *microgramme*
µL : *microlitre*
µm : *micromètre*
µM : *micromolaire*

PUBLICATIONS

Fabrice NAVARRO
Laboratoire de physiologie intégrative cellulaire et moléculaire
UMR CNRS 5123
Bât. R. DUBOIS
69622 Villeurbanne cedex
Tél : 0472445840
e-mail : Fabrice.Navarro@univ-lyon1.fr ou fabricenavarro@hotmail.com

Articles publiés dans des revues à comités de lecture :

- **Navarro FP**, Sanchez P, Fares R, Georges B, Nadam J, Moulin C, Morales A, Pequignot JM, and Bezin L (2007): *Brain heparanase is upregulated during postnatal development and hypoxia-induced neovascularization in adult rats, Journal of Neurochemistry (In Press)*

- Nadam J, **Navarro F** , Sanchez P, Moulin C, Georges B, Laglaine A, Pequignot JM, Morales M, Ryvlin P, and Bezin L (2007) :*Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus, Neurobiology of Disease 25 p412–426*

- Morales A, Bonnet C, Bourgoin N, Touvier T, Nadam J, Laglaine A, **Navarro F**, Moulin C, Georges B, Pequignot JM, and Bezin L (2006) : *Unexpected expression of orexin-B in basal conditions and increased levels in the adult rat hippocampus during pilocarpine-induced epileptogenesis, Brain Research 1109 p164-175*

Articles soumis dans des revues à comités de lecture :

- Sanchez PE*, **Navarro FP***, Nadam J*, Georges B, Moulin C, Le Cavorsin M, Pequignot JM, Morales A, and Bezin L (2007): *Novel insights into the receptor complex mediating brain effects of erythropoietin throughout lifespan, Submitted in FASEB.*

** ces co-auteurs ont contribué de façon égale à l'étude et sont listés dans l'ordre alphabétique inverse*

- Ogier M, Bricca G, **Navarro FP**, Pequignot JM, Bader M, Morales A and Bezin L (2007): *Protein translocation into dendrites: implication of glia-derived angiotensins in noradrenergic brainstem neurons, Submitted in Neuron*

Articles en préparation en vue d'une soumission dans des revues à comités de lecture :

- **Navarro FP**, Nadam J, Bourgoin N, Fares R, Moulin C, Georges B, Le Cavorsin M, Ryvlin P, Pequignot JM, Morales A, and Bezin L (2007): *Effects of anti-inflammatory drugs, methylprednisolone and indomethacin, in the adult rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus ,Expected submission in Neurobiology of Diseases*

- **Navarro FP**, Sanchez PE, Le Cavorsin M, Georges B, Moulin C, Pequignot JM, Morales A and Bezin L (2007): *Induction of heparanase and infiltration of myeloid cells in the adult rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus ,Expected submission in Journal of Neuroscience*

Communications orales affichées :

- **Navarro FP**, Morales A, Moulin C, Georges B, Ryvlin P, and Bezin L : *Hippocampal inflammation associated with IL-1ß superinduction early following pilocarpine-initiated status epilepticus in adult rats may be maintained in the long-term due to diazepam-induced IL-1 RA depletion/26th International Epilepsy Congress, Paris, 28/08-01/09/2005*

- **Navarro FP:** *Caractérisation de la neuro-inflammation dans l'hippocampe au cours de l'épileptogenèse, Séminaire CEA-Orsay, Orsay, 25/06/2007*

BIBLIOGRAPHIE

[1] G. Abboud-Jarrous, Z. Rangini-Guetta, H. Aingorn, R. Atzmon, S. Elgavish, T. Peretz and I. Vlodavsky, Site-directed mutagenesis, proteolytic cleavage, and activation of human proheparanase, J Biol Chem 280 (2005) 13568-13575.

[2] P.A. Aeed, M. Nakajima and D.R. Welch, The role of polymorphonuclear leukocytes (PMN) on the growth and metastatic potential of 13762NF mammary adenocarcinoma cells, Int J Cancer 42 (1988) 748-759.

[3] S.M. Allan, P.J. Tyrrell and N.J. Rothwell, Interleukin-1 and neuronal injury, Nat Rev Immunol 5 (2005) 629-640.

[4] F. Aloisi, Immune function of microglia, Glia 36 (2001) 165-179.

[5] D.G. Amaral, A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat, J Comp Neurol 182 (1978) 851-914.

[6] D.G. Amaral and M.P. Witter, The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data, Neuroscience 31 (1989) 571-591.

[7] H.A. Arnett, J. Mason, M. Marino, K. Suzuki, G.K. Matsushima and J.P. Ting, TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination, Nat Neurosci 4 (2001) 1116-1122.

[8] B. Arvin, L.F. Neville, F.C. Barone and G.Z. Feuerstein, The role of inflammation and cytokines in brain injury, Neurosci Biobehav Rev 20 (1996) 445-452.

[9] S. Ashikari-Hada, H. Habuchi, Y. Kariya and K. Kimata, Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins, J Biol Chem 280 (2005) 31508-31515.

[10] G. Avanzini and S. Franceschetti, Cellular biology of epileptogenesis, Lancet Neurol 2 (2003) 33-42.

[11] A.A. Babcock, W.A. Kuziel, S. Rivest and T. Owens, Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS, J Neurosci 23 (2003) 7922-7930.

[12] E.J. Baik, E.J. Kim, S.H. Lee and C. Moon, Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus, Brain Res 843 (1999) 118-129.

[13] S. Balosso, T. Ravizza, C. Perego, J. Peschon, I.L. Campbell, M.G. De Simoni and A. Vezzani, Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors, Ann Neurol 57 (2005) 804-812.

[14] F.C. Barone, B. Arvin, R.F. White, A. Miller, C.L. Webb, R.N. Willette, P.G. Lysko and G.Z. Feuerstein, Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury, Stroke 28 (1997) 1233-1244.

[15] P. Bashkin, S. Doctrow, M. Klagsbrun, C.M. Svahn, J. Folkman and I. Vlodavsky, Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules, Biochemistry 28 (1989) 1737-1743.

[16] T.G. Beach, W.B. Woodhurst, D.B. MacDonald and M.W. Jones, Reactive microglia in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy, Neurosci Lett 191 (1995) 27-30.

[17] J. Beaurain, S. Clemenceau, C. Duyckaerts, J. Benavides, M. Baulac, J.J. Hauw and J. Philippon, [Morphometric and radioautographic study of neuronal loss and gliosis in sclerosis of the hippocampus associated with temporal lobe epilepsy], Chirurgie 120 (1994) 486-493.

[18] I. Bechmann, J. Goldmann, A.D. Kovac, E. Kwidzinski, E. Simburger, F. Naftolin, U. Dirnagl, R. Nitsch and J. Priller, Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia, Faseb J 19 (2005) 647-649.
[19] I. Bechmann, J. Priller, A. Kovac, M. Bontert, T. Wehner, F.F. Klett, J. Bohsung, M. Stuschke, U. Dirnagl and R. Nitsch, Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages, Eur J Neurosci 14 (2001) 1651-1658.
[20] P. Beckhove, B.M. Helmke, Y. Ziouta, M. Bucur, W. Dorner, C. Mogler, G. Dyckhoff and C. Herold-Mende, Heparanase expression at the invasion front of human head and neck cancers and correlation with poor prognosis, Clin Cancer Res 11 (2005) 2899-2906.
[21] M.D. Bell, D.D. Taub and V.H. Perry, Overriding the brain's intrinsic resistance to leukocyte recruitment with intraparenchymal injections of recombinant chemokines, Neuroscience 74 (1996) 283-292.
[22] S. Benhamron, H. Nechushtan, I. Verbovetski, A. Krispin, G. Abboud-Jarrous, E. Zcharia, E. Edovitsky, E. Nahari, T. Peretz, I. Vlodavsky and D. Mevorach, Translocation of active heparanase to cell surface regulates degradation of extracellular matrix heparan sulfate upon transmigration of mature monocyte-derived dendritic cells, J Immunol 176 (2006) 6417-6424.
[23] D. Bernard, B. Mehul, C. Delattre, L. Simonetti, A. Thomas-Collignon and R. Schmidt, Purification and characterization of the endoglycosidase heparanase 1 from human plantar stratum corneum: a key enzyme in epidermal physiology?, J Invest Dermatol 117 (2001) 1266-1273.
[24] M. Bernfield, M. Gotte, P.W. Park, O. Reizes, M.L. Fitzgerald, J. Lincecum and M. Zako, Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans, Annu Rev Biochem 68 (1999) 729-777.
[25] R. Beschorner, T.D. Nguyen, F. Gozalan, I. Pedal, R. Mattern, H.J. Schluesener, R. Meyermann and J.M. Schwab, CD14 expression by activated parenchymal microglia/macrophages and infiltrating monocytes following human traumatic brain injury, Acta Neuropathol (Berl) 103 (2002) 541-549.
[26] R. Beschorner, H.J. Schluesener, F. Gozalan, R. Meyermann and J.M. Schwab, Infiltrating CD14+ monocytes and expression of CD14 by activated parenchymal microglia/macrophages contribute to the pool of CD14+ cells in ischemic brain lesions, J Neuroimmunol 126 (2002) 107-115.
[27] I. Blumcke, B. Suter, K. Behle, R. Kuhn, J. Schramm, C.E. Elger and O.D. Wiestler, Loss of hilar mossy cells in Ammon's horn sclerosis, Epilepsia 41 Suppl 6 (2000) S174-180.
[28] S. Bonde, C.T. Ekdahl and O. Lindvall, Long-term neuronal replacement in adult rat hippocampus after status epilepticus despite chronic inflammation, Eur J Neurosci 23 (2006) 965-974.
[29] K. Borges, D. McDermott, H. Irier, Y. Smith and R. Dingledine, Degeneration and proliferation of astrocytes in the mouse dentate gyrus after pilocarpine-induced status epilepticus, Exp Neurol 201 (2006) 416-427.
[30] H. Boutin, R.A. LeFeuvre, R. Horai, M. Asano, Y. Iwakura and N.J. Rothwell, Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage, J Neurosci 21 (2001) 5528-5534.
[31] P. Bovolenta and E. Marti, Introduction: unexpected roles for morphogens in the development and regeneration of the CNS, J Neurobiol 64 (2005) 321-323.
[32] M.B. Bracken, Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence, Spine 26 (2001) S47-54.
[33] D.M. Bryant and J.L. Stow, Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor, Traffic 6 (2005) 947-954.
[34] R.J. Buono, T.N. Ferraro, M.J. O'Connor, M.R. Sperling, S.G. Ryan, T. Scattergood, N. Mulholland, J. Gilmore, F.W. Lohoff and W.H. Berrettini, Lack of association

between an interleukin 1 beta (IL-1beta) gene variation and refractory temporal lobe epilepsy, Epilepsia 42 (2001) 782-784.
[35] B.J. Burbach, A. Friedl, C. Mundhenke and A.C. Rapraeger, Syndecan-1 accumulates in lysosomes of poorly differentiated breast carcinoma cells, Matrix Biol 22 (2003) 163-177.
[36] I.L. Campbell, C.R. Abraham, E. Masliah, P. Kemper, J.D. Inglis, M.B. Oldstone and L. Mucke, Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6, Proc Natl Acad Sci U S A 90 (1993) 10061-10065.
[37] M.J. Carson, Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: functional implications for multiple sclerosis, Glia 40 (2002) 218-231.
[38] E.A. Carswell, L.J. Old, R.L. Kassel, S. Green, N. Fiore and B. Williamson, An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors, Proc Natl Acad Sci U S A 72 (1975) 3666-3670.
[39] L. Cartier, O. Hartley, M. Dubois-Dauphin and K.H. Krause, Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases, Brain Res Brain Res Rev 48 (2005) 16-42.
[40] A. Cauwels, K. Frei, S. Sansano, C. Fearns, R. Ulevitch, W. Zimmerli and R. Landmann, The origin and function of soluble CD14 in experimental bacterial meningitis, J Immunol 162 (1999) 4762-4772.
[41] G.L. Cavalleri, J.M. Lynch, C. Depondt, M.W. Burley, N.W. Wood, S.M. Sisodiya and D.B. Goldstein, Failure to replicate previously reported genetic associations with sporadic temporal lobe epilepsy: where to from here?, Brain 128 (2005) 1832-1840.
[42] A. Cetin, K. Nas, H. Buyukbayram, A. Ceviz and G. Olmez, The effects of systemically administered methylprednisolone and recombinant human erythropoietin after acute spinal cord compressive injury in rats, Eur Spine J 15 (2006) 1539-1544.
[43] C.C. Chao, S. Hu, L. Ehrlich and P.K. Peterson, Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors, Brain Behav Immun 9 (1995) 355-365.
[44] G. Chen, D. Wang, R. Vikramadithyan, H. Yagyu, U. Saxena, S. Pillarisetti and I.J. Goldberg, Inflammatory cytokines and fatty acids regulate endothelial cell heparanase expression, Biochemistry 43 (2004) 4971-4977.
[45] B. Cheng, S. Christakos and M.P. Mattson, Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis, Neuron 12 (1994) 139-153.
[46] E. Cohen, R. Atzmon, I. Vlodavsky and N. Ilan, Heparanase processing by lysosomal/endosomal protein preparation, FEBS Lett 579 (2005) 2334-2338.
[47] G.J. Cole and C.F. McCabe, Identification of a developmentally regulated keratan sulfate proteoglycan that inhibits cell adhesion and neurite outgrowth, Neuron 7 (1991) 1007-1018.
[48] A. Crespel, P. Coubes, M.C. Rousset, C. Brana, A. Rougier, G. Rondouin, J. Bockaert, M. Baldy-Moulinier and M. Lerner-Natoli, Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, Brain Res 952 (2002) 159-169.
[49] F. de Bock, J. Dornand and G. Rondouin, Release of TNF alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage, Neuroreport 7 (1996) 1125-1129.
[50] E.R. De Kloet, E. Vreugdenhil, M.S. Oitzl and M. Joels, Brain corticosteroid receptor balance in health and disease, Endocr Rev 19 (1998) 269-301.
[51] N.C. de Lanerolle, J.H. Kim, A. Williamson, S.S. Spencer, H.P. Zaveri, T. Eid and D.D. Spencer, A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories, Epilepsia 44 (2003) 677-687.
[52] N.C. de Lanerolle and T.S. Lee, New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy, Epilepsy Behav 7 (2005) 190-203.

[53] A.M. de Mestre, L.M. Khachigian, F.S. Santiago, M.A. Staykova and M.D. Hulett, Regulation of inducible heparanase gene transcription in activated T cells by early growth response 1, J Biol Chem 278 (2003) 50377-50385.
[54] A.M. de Mestre, T. Soe-Htwe, E.L. Sutcliffe, S. Rao, E.B. Pagler, J.R. Hornby and M.D. Hulett, Regulation of mouse Heparanase gene expression in T lymphocytes and tumor cells, Immunol Cell Biol (2007).
[55] M.G. De Simoni, C. Perego, T. Ravizza, D. Moneta, M. Conti, F. Marchesi, A. De Luigi, S. Garattini and A. Vezzani, Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus, Eur J Neurosci 12 (2000) 2623-2633.
[56] L.A. Dempsey, G.J. Brunn and J.L. Platt, Heparanase, a potential regulator of cell-matrix interactions, Trends Biochem Sci 25 (2000) 349-351.
[57] L.A. Dempsey, T.B. Plummer, S.L. Coombes and J.L. Platt, Heparanase expression in invasive trophoblasts and acute vascular damage, Glycobiology 10 (2000) 467-475.
[58] A.D. Dick, M. Pell, B.J. Brew, E. Foulcher and J.D. Sedgwick, Direct ex vivo flow cytometric analysis of human microglial cell CD4 expression: examination of central nervous system biopsy specimens from HIV-seropositive patients and patients with other neurological disease, Aids 11 (1997) 1699-1708.
[59] R. Diem, M. Hobom, K. Maier, R. Weissert, M.K. Storch, R. Meyer and M. Bahr, Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during autoimmune CNS inflammation by inhibition of an endogenous neuroprotective pathway, J Neurosci 23 (2003) 6993-7000.
[60] K. Dinkel, A. MacPherson and R.M. Sapolsky, Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS, J Neurochem 84 (2003) 705-716.
[61] J. Dong, A.K. Kukula, M. Toyoshima and M. Nakajima, Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene, Gene 253 (2000) 171-178.
[62] I. Doweck, V. Kaplan-Cohen, I. Naroditsky, E. Sabo, N. Ilan and I. Vlodavsky, Heparanase localization and expression by head and neck cancer: correlation with tumor progression and patient survival, Neoplasia 8 (2006) 1055-1061.
[63] J.S. Duncan, J.W. Sander, S.M. Sisodiya and M.C. Walker, Adult epilepsy, Lancet 367 (2006) 1087-1100.
[64] E. Edovitsky, M. Elkin, E. Zcharia, T. Peretz and I. Vlodavsky, Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis, J Natl Cancer Inst 96 (2004) 1219-1230.
[65] E. Edovitsky, I. Lerner, E. Zcharia, T. Peretz, I. Vlodavsky and M. Elkin, Role of endothelial heparanase in delayed-type hypersensitivity, Blood 107 (2006) 3609-3616.
[66] C.T. Ekdahl, J.H. Claasen, S. Bonde, Z. Kokaia and O. Lindvall, Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain, Proc Natl Acad Sci U S A 100 (2003) 13632-13637.
[67] M. Elkin, N. Ilan, R. Ishai-Michaeli, Y. Friedmann, O. Papo, I. Pecker and I. Vlodavsky, Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action, Faseb J 15 (2001) 1661-1663.
[68] J. Engel, Jr., Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned?, Neuroscientist 7 (2001) 340-352.
[69] C. Eriksson, R. Tehranian, K. Iverfeldt, B. Winblad and M. Schultzberg, Increased expression of mRNA encoding interleukin-1beta and caspase-1, and the secreted isoform of interleukin-1 receptor antagonist in the rat brain following systemic kainic acid administration, J Neurosci Res 60 (2000) 266-279.
[70] C. Eriksson, A.M. Van Dam, P.J. Lucassen, J.G. Bol, B. Winblad and M. Schultzberg, Immunohistochemical localization of interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta converting enzyme/caspase-1 in the rat brain after peripheral administration of kainic acid, Neuroscience 93 (1999) 915-930.

[71] M.B. Fairbanks, A.M. Mildner, J.W. Leone, G.S. Cavey, W.R. Mathews, R.F. Drong, J.L. Slightom, M.J. Bienkowski, C.W. Smith, C.A. Bannow and R.L. Heinrikson, Processing of the human heparanase precursor and evidence that the active enzyme is a heterodimer, J Biol Chem 274 (1999) 29587-29590.
[72] A. Faissner, A. Clement, A. Lochter, A. Streit, C. Mandl and M. Schachner, Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties, J Cell Biol 126 (1994) 783-799.
[73] W.L. Farrar, P.L. Kilian, M.R. Ruff, J.M. Hill and C.B. Pert, Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain, J Immunol 139 (1987) 459-463.
[74] N.S. Fedarko and H.E. Conrad, A unique heparan sulfate in the nuclei of hepatocytes: structural changes with the growth state of the cells, J Cell Biol 102 (1986) 587-599.
[75] N.S. Fedarko, M. Ishihara and H.E. Conrad, Control of cell division in hepatoma cells by exogenous heparan sulfate proteoglycan, J Cell Physiol 139 (1989) 287-294.
[76] J. Folkman, M. Klagsbrun, J. Sasse, M. Wadzinski, D. Ingber and I. Vlodavsky, A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane, Am J Pathol 130 (1988) 393-400.
[77] C. Freeman, A.M. Browne and C.R. Parish, Evidence that platelet and tumour heparanases are similar enzymes, Biochem J 342 (Pt 2) (1999) 361-368.
[78] C. Freeman and C.R. Parish, Human platelet heparanase: purification, characterization and catalytic activity, Biochem J 330 (Pt 3) (1998) 1341-1350.
[79] R.A. French, R.W. VanHoy, R. Chizzonite, J.F. Zachary, R. Dantzer, P. Parnet, R.M. Bluthe and K.W. Kelley, Expression and localization of p80 and p68 interleukin-1 receptor proteins in the brain of adult mice, J Neuroimmunol 93 (1999) 194-202.
[80] T.F. Freund and G. Buzsaki, Interneurons of the hippocampus, Hippocampus 6 (1996) 347-470.
[81] R. Fridman, O. Lider, Y. Naparstek, Z. Fuks, I. Vlodavsky and I.R. Cohen, Soluble antigen induces T lymphocytes to secrete an endoglycosidase that degrades the heparan sulfate moiety of subendothelial extracellular matrix, J Cell Physiol 130 (1987) 85-92.
[82] Y. Friedmann, I. Vlodavsky, H. Aingorn, A. Aviv, T. Peretz, I. Pecker and O. Pappo, Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis, Am J Pathol 157 (2000) 1167-1175.
[83] B.A. Frosch, I. Berquin, M.R. Emmert-Buck, K. Moin and B.F. Sloane, Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B, Apmis 107 (1999) 28-37.
[84] F.H. Gage, G. Kempermann, T.D. Palmer, D.A. Peterson and J. Ray, Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus, J Neurobiol 36 (1998) 249-266.
[85] E.E. Geisert, Jr. and D.J. Bidanset, A central nervous system keratan sulfate proteoglycan: localization to boundaries in the neonatal rat brain, Brain Res Dev Brain Res 75 (1993) 163-173.
[86] J.M. Gidday, Y.G. Gasche, J.C. Copin, A.R. Shah, R.S. Perez, S.D. Shapiro, P.H. Chan and T.S. Park, Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia, Am J Physiol Heart Circ Physiol 289 (2005) H558-568.
[87] D. Gilat, R. Hershkoviz, I. Goldkorn, L. Cahalon, G. Korner, I. Vlodavsky and O. Lider, Molecular behavior adapts to context: heparanase functions as an extracellular matrix-degrading enzyme or as a T cell adhesion molecule, depending on the local pH, J Exp Med 181 (1995) 1929-1934.
[88] D. Gilat, R. Hershkoviz, Y.A. Mekori, I. Vlodavsky and O. Lider, Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta, J Immunol 153 (1994) 4899-4906.

[89] S. Gingis-Velitski, A. Zetser, V. Kaplan, O. Ben-Zaken, E. Cohen, F. Levy-Adam, Y. Bashenko, M.Y. Flugelman, I. Vlodavsky and N. Ilan, Heparanase uptake is mediated by cell membrane heparan sulfate proteoglycans, J Biol Chem 279 (2004) 44084-44092.
[90] K. Gohji, M. Okamoto, S. Kitazawa, M. Toyoshima, J. Dong, Y. Katsuoka and M. Nakajima, Heparanase protein and gene expression in bladder cancer, J Urol 166 (2001) 1286-1290.
[91] O. Goldshmidt, L. Nadav, H. Aingorn, C. Irit, N. Feinstein, N. Ilan, E. Zamir, B. Geiger, I. Vlodavsky and B.Z. Katz, Human heparanase is localized within lysosomes in a stable form, Exp Cell Res 281 (2002) 50-62.
[92] O. Goldshmidt, E. Zcharia, R. Abramovitch, S. Metzger, H. Aingorn, Y. Friedmann, V. Schirrmacher, E. Mitrani and I. Vlodavsky, Cell surface expression and secretion of heparanase markedly promote tumor angiogenesis and metastasis, Proc Natl Acad Sci U S A 99 (2002) 10031-10036.
[93] O. Goldshmidt, E. Zcharia, H. Aingorn, Z. Guatta-Rangini, R. Atzmon, I. Michal, I. Pecker, E. Mitrani and I. Vlodavsky, Expression pattern and secretion of human and chicken heparanase are determined by their signal peptide sequence, J Biol Chem 276 (2001) 29178-29187.
[94] O. Goldshmidt, E. Zcharia, M. Cohen, H. Aingorn, I. Cohen, L. Nadav, B.Z. Katz, B. Geiger and I. Vlodavsky, Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity, Faseb J 17 (2003) 1015-1025.
[95] J.A. Gomes, R.D. Stevens, J.J. Lewin, 3rd, M.A. Mirski and A. Bhardwaj, Glucocorticoid therapy in neurologic critical care, Crit Care Med 33 (2005) 1214-1224.
[96] R. Goshen, A.A. Hochberg, G. Korner, E. Levy, R. Ishai-Michaeli, M. Elkin, N. de Groot and I. Vlodavsky, Purification and characterization of placental heparanase and its expression by cultured cytotrophoblasts, Mol Hum Reprod 2 (1996) 679-684.
[97] D. Gosselin and S. Rivest, Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system, Brain Behav Immun 21 (2007) 281-289.
[98] M. Gotte, Syndecans in inflammation, Faseb J 17 (2003) 575-591.
[99] L.D. Graham and P.A. Underwood, Comparison of the heparanase enzymes from mouse melanoma cells, mouse macrophages, and human platelets, Biochem Mol Biol Int 39 (1996) 563-571.
[100] P.W. Gray, D. Glaister, E. Chen, D.V. Goeddel and D. Pennica, Two interleukin 1 genes in the mouse: cloning and expression of the cDNA for murine interleukin 1 beta, J Immunol 137 (1986) 3644-3648.
[101] G.J. Guillemin and B.J. Brew, Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification, J Leukoc Biol 75 (2004) 388-397.
[102] S. Guimond, K. Turner, M. Kita, M. Ford-Perriss and J. Turnbull, Dynamic biosynthesis of heparan sulphate sequences in developing mouse brain: a potential regulatory mechanism during development, Biochem Soc Trans 29 (2001) 177-181.
[103] G. Haegeman, J. Content, G. Volckaert, R. Derynck, J. Tavernier and W. Fiers, Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts, Eur J Biochem 159 (1986) 625-632.
[104] N.P. Hailer, A. Grampp and R. Nitsch, Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study, Eur J Neurosci 11 (1999) 3359-3364.
[105] S. Haspolat, Y. Baysal, O. Duman, M. Coskun, O. Tosun and O. Yegin, Interleukin-1alpha, interleukin-1beta, and interleukin-1Ra polymorphisms in febrile seizures, J Child Neurol 20 (2005) 565-568.

[106] B. Hattiangady, M.S. Rao and A.K. Shetty, Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus, Neurobiol Dis 17 (2004) 473-490.
[107] A. Heils, K. Haug, W.S. Kunz, G. Fernandez, S. Horvath, J. Rebstock, P. Propping and C.E. Elger, Interleukin-1beta gene polymorphism and susceptibility to temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, Ann Neurol 48 (2000) 948-950.
[108] C. Helmstaedter, M. Kurthen, S. Lux, M. Reuber and C.E. Elger, Chronic epilepsy and cognition: a longitudinal study in temporal lobe epilepsy, Ann Neurol 54 (2003) 425-432.
[109] M.T. Heneka and M.K. O'Banion, Inflammatory processes in Alzheimer's disease, J Neuroimmunol 184 (2007) 69-91.
[110] M.E. Herndon and A.D. Lander, A diverse set of developmentally regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system, Neuron 4 (1990) 949-961.
[111] D.C. Hess, T. Abe, W.D. Hill, A.M. Studdard, J. Carothers, M. Masuya, P.A. Fleming, C.J. Drake and M. Ogawa, Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain, Exp Neurol 186 (2004) 134-144.
[112] D.C. Hess, W.D. Hill, A. Martin-Studdard, J. Carroll, J. Brailer and J. Carothers, Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells After stroke, Stroke 33 (2002) 1362-1368.
[113] W.F. Hickey, Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system, Glia 36 (2001) 118-124.
[114] A.J. Hoogewerf, J.W. Leone, I.M. Reardon, W.J. Howe, D. Asa, R.L. Heinrikson and S.R. Ledbetter, CXC chemokines connective tissue activating peptide-III and neutrophil activating peptide-2 are heparin/heparan sulfate-degrading enzymes, J Biol Chem 270 (1995) 3268-3277.
[115] M. Hook, A. Wasteson and A. Oldberg, A heparan sulfate-degrading endoglycosidase from rat liver tissue, Biochem Biophys Res Commun 67 (1975) 1422-1428.
[116] K.J. Hopkins, G. Wang and L.C. Schmued, Temporal progression of kainic acid induced neuronal and myelin degeneration in the rat forebrain, Brain Res 864 (2000) 69-80.
[117] N. Hosomi, C.R. Ban, T. Naya, T. Takahashi, P. Guo, X.Y. Song and M. Kohno, Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia, J Cereb Blood Flow Metab 25 (2005) 959-967.
[118] M.D. Hulett, C. Freeman, B.J. Hamdorf, R.T. Baker, M.J. Harris and C.R. Parish, Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis, Nat Med 5 (1999) 803-809.
[119] M.D. Hulett, J.R. Hornby, S.J. Ohms, J. Zuegg, C. Freeman, J.E. Gready and C.R. Parish, Identification of active-site residues of the pro-metastatic endoglycosidase heparanase, Biochemistry 39 (2000) 15659-15667.
[120] N.S. Ihrcke, W. Parker, K.J. Reissner and J.L. Platt, Regulation of platelet heparanase during inflammation: role of pH and proteinases, J Cell Physiol 175 (1998) 255-267.
[121] C. Ikonomidou-Turski, E.A. Cavalheiro, L. Turski, Z.A. Bortolotto, Z. Kleinrok, L.S. Calderazzo-Filho and W.A. Turski, Differential effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on seizures produced by pilocarpine in rats, Brain Res 462 (1988) 275-285.
[122] N. Ilan, M. Elkin and I. Vlodavsky, Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis, Int J Biochem Cell Biol 38 (2006) 2018-2039.
[123] S.E. Ilyin, D. Gayle, M.C. Flynn and C.R. Plata-Salaman, Interleukin-1beta system (ligand, receptor type I, receptor accessory protein and receptor antagonist), TNF-alpha, TGF-beta1 and neuropeptide Y mRNAs in specific brain regions during bacterial LPS-induced anorexia, Brain Res Bull 45 (1998) 507-515.

[124] M. Inatani and Y. Yamaguchi, Gene expression of EXT1 and EXT2 during mouse brain development, Brain Res Dev Brain Res 141 (2003) 129-136.
[125] R.V. Iozzo, Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling, Nat Rev Mol Cell Biol 6 (2005) 646-656.
[126] R.V. Iozzo, Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions, J Clin Invest 108 (2001) 165-167.
[127] R. Ishai-Michaeli, A. Eldor and I. Vlodavsky, Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix, Cell Regul 1 (1990) 833-842.
[128] M. Ishihara and H.E. Conrad, Correlations between heparan sulfate metabolism and hepatoma growth, J Cell Physiol 138 (1989) 467-476.
[129] M. Ishihara, N.S. Fedarko and H.E. Conrad, Transport of heparan sulfate into the nuclei of hepatocytes, J Biol Chem 261 (1986) 13575-13580.
[130] J.L. Jankowsky and P.H. Patterson, The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae, Prog Neurobiol 63 (2001) 125-149.
[131] C. Jiang, A.T. Ting and B. Seed, PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines, Nature 391 (1998) 82-86.
[132] L. Jin, Y. Jia, B. Zhang, Q. Xu, Y. Fan, L. Wu and Y. Shen, Association analysis of a polymorphism of interleukin 1 beta (IL-1 beta) gene with temporal lobe epilepsy in a Chinese population, Epilepsia 44 (2003) 1306-1309.
[133] A.V. Kalueff, K.A. Lehtimaki, A. Ylinen, J. Honkaniemi and J. Peltola, Intranasal administration of human IL-6 increases the severity of chemically induced seizures in rats, Neurosci Lett 365 (2004) 106-110.
[134] K. Kanemoto, J. Kawasaki, T. Miyamoto, H. Obayashi and M. Nishimura, Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy, Ann Neurol 47 (2000) 571-574.
[135] K. Kanemoto, J. Kawasaki, S. Yuasa, T. Kumaki, O. Tomohiro, R. Kaji and M. Nishimura, Increased frequency of interleukin-1beta-511T allele in patients with temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, and prolonged febrile convulsion, Epilepsia 44 (2003) 796-799.
[136] T.C. Kang, D.S. Kim, S.E. Kwak, J.E. Kim, M.H. Won, D.W. Kim, S.Y. Choi and O.S. Kwon, Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy, Glia 54 (2006) 258-271.
[137] T. Kelly, L.J. Suva, Y. Huang, V. Macleod, H.Q. Miao, R.C. Walker and R.D. Sanderson, Expression of heparanase by primary breast tumors promotes bone resorption in the absence of detectable bone metastases, Cancer Res 65 (2005) 5778-5784.
[138] S. Kida, P.V. Steart, E.T. Zhang and R.O. Weller, Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages, Acta Neuropathol (Berl) 85 (1993) 646-652.
[139] S.U. Kim and J. de Vellis, Microglia in health and disease, J Neurosci Res 81 (2005) 302-313.
[140] K. Kinouchi, G. Brown, G. Pasternak and D.B. Donner, Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor-alpha in the brain, Biochem Biophys Res Commun 181 (1991) 1532-1538.
[141] R. Kira, H. Torisu, M. Takemoto, A. Nomura, Y. Sakai, M. Sanefuji, K. Sakamoto, S. Matsumoto, K. Gondo and T. Hara, Genetic susceptibility to simple febrile seizures: interleukin-1beta promoter polymorphisms are associated with sporadic cases, Neurosci Lett 384 (2005) 239-244.
[142] L. Kjellen and U. Lindahl, Proteoglycans: structures and interactions, Annu Rev Biochem 60 (1991) 443-475.
[143] M. Klagsbrun, Mediators of angiogenesis: the biological significance of basic fibroblast growth factor (bFGF)-heparin and heparan sulfate interactions, Semin Cancer Biol 3 (1992) 81-87.

[144] M. Kobayashi, Y. Naomoto, T. Nobuhisa, T. Okawa, M. Takaoka, Y. Shirakawa, T. Yamatsuji, J. Matsuoka, T. Mizushima, H. Matsuura, M. Nakajima, H. Nakagawa, A. Rustgi and N. Tanaka, Heparanase regulates esophageal keratinocyte differentiation through nuclear translocation and heparan sulfate cleavage, Differentiation 74 (2006) 235-243.
[145] M.A. Kosir, P.A. Foley-Loudon, R. Finkenauer and S.D. Tennenberg, Multiple heparanases are expressed in polymorphonuclear cells, J Surg Res 103 (2002) 100-108.
[146] J. Kreuger, D. Spillmann, J.P. Li and U. Lindahl, Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity, J Cell Biol 174 (2006) 323-327.
[147] P.H. Kussie, J.D. Hulmes, D.L. Ludwig, S. Patel, E.C. Navarro, A.P. Seddon, N.A. Giorgio and P. Bohlen, Cloning and functional expression of a human heparanase gene, Biochem Biophys Res Commun 261 (1999) 183-187.
[148] R. Ladeby, M. Wirenfeldt, D. Garcia-Ovejero, C. Fenger, L. Dissing-Olesen, I. Dalmau and B. Finsen, Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system, Brain Res Brain Res Rev 48 (2005) 196-206.
[149] N. Laflamme and S. Rivest, Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components, Faseb J 15 (2001) 155-163.
[150] R. Laskov, R.I. Michaeli, H. Sharir, E. Yefenof and I. Vlodavsky, Production of heparanase by normal and neoplastic murine B-lymphocytes, Int J Cancer 47 (1991) 92-98.
[151] N. Lebeurrier, G. Liot, J.P. Lopez-Atalaya, C. Orset, M. Fernandez-Monreal, P. Sonderegger, C. Ali and D. Vivien, The brain-specific tissue-type plasminogen activator inhibitor, neuroserpin, protects neurons against excitotoxicity both in vitro and in vivo, Mol Cell Neurosci 30 (2005) 552-558.
[152] K.A. Lehtimaki, J. Peltola, E. Koskikallio, T. Keranen and J. Honkaniemi, Expression of cytokines and cytokine receptors in the rat brain after kainic acid-induced seizures, Brain Res Mol Brain Res 110 (2003) 253-260.
[153] I.P. Levshina, N.V. Pasikova and N.N. Shuikin, Acquisition of a conditioned avoidance reflex and morphometric characteristics of the sensorimotor cortex in rats subjected to social deprivation in early ontogenesis, Neurosci Behav Physiol 36 (2006) 693-701.
[154] F. Levy-Adam, G. Abboud-Jarrous, M. Guerrini, D. Beccati, I. Vlodavsky and N. Ilan, Identification and characterization of heparin/heparan sulfate binding domains of the endoglycosidase heparanase, J Biol Chem 280 (2005) 20457-20466.
[155] F. Levy-Adam, H.Q. Miao, R.L. Heinrikson, I. Vlodavsky and N. Ilan, Heterodimer formation is essential for heparanase enzymatic activity, Biochem Biophys Res Commun 308 (2003) 885-891.
[156] O. Lider, L. Cahalon, D. Gilat, R. Hershkoviz, D. Siegel, R. Margalit, O. Shoseyov and I.R. Cohen, A disaccharide that inhibits tumor necrosis factor alpha is formed from the extracellular matrix by the enzyme heparanase, Proc Natl Acad Sci U S A 92 (1995) 5037-5041.
[157] X. Lin, Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development, Development 131 (2004) 6009-6021.
[158] X. Lin, E.M. Buff, N. Perrimon and A.M. Michelson, Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during Drosophila embryonic development, Development 126 (1999) 3715-3723.
[159] T. Lind, F. Tufaro, C. McCormick, U. Lindahl and K. Lidholt, The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate, J Biol Chem 273 (1998) 26265-26268.
[160] U. Lindahl, M. Kusche-Gullberg and L. Kjellen, Regulated diversity of heparan sulfate, J Biol Chem 273 (1998) 24979-24982.

[161] S.A. Loddick, C. Liu, T. Takao, K. Hashimoto and E.B. De Souza, Interleukin-1 receptors: cloning studies and role in central nervous system disorders, Brain Res Brain Res Rev 26 (1998) 306-319.
[162] C.E. Loscher, K.H. Mills and M.A. Lynch, Interleukin-1 receptor antagonist exerts agonist activity in the hippocampus independent of the interleukin-1 type I receptor, J Neuroimmunol 137 (2003) 117-124.
[163] M. Majores, J. Eils, O.D. Wiestler and A.J. Becker, Molecular profiling of temporal lobe epilepsy: comparison of data from human tissue samples and animal models, Epilepsy Res 60 (2004) 173-178.
[164] C.J. March, B. Mosley, A. Larsen, D.P. Cerretti, G. Braedt, V. Price, S. Gillis, C.S. Henney, S.R. Kronheim, K. Grabstein and et al., Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs, Nature 315 (1985) 641-647.
[165] D. Marchetti, J. Li and R. Shen, Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase, Cancer Res 60 (2000) 4767-4770.
[166] D. Marchetti, D. Menter, L. Jin, M. Nakajima and G.L. Nicolson, Nerve growth factor effects on human and mouse melanoma cell invasion and heparanase production, Int J Cancer 55 (1993) 692-699.
[167] R.K. Margolis and R.U. Margolis, Nervous tissue proteoglycans, Experientia 49 (1993) 429-446.
[168] R.U. Margolis and R.K. Margolis, Properties of nervous tissue proteoglycans relevant to studies on Alzheimer's disease, Neurobiol Aging 10 (1989) 500-502; discussion 510-502.
[169] H. Marini, D. Altavilla, M. Bellomo, E.B. Adamo, R. Marini, F. Laureanti, M.C. Bonaccorso, P. Seminara, M. Passaniti, L. Minutoli, A. Bitto, G. Calapai and F. Squadrito, Modulation of IL-1 beta gene expression by lipid peroxidation inhibition after kainic acid-induced rat brain injury, Exp Neurol 188 (2004) 178-186.
[170] M. Massengale, A.J. Wagers, H. Vogel and I.L. Weissman, Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain, J Exp Med 201 (2005) 1579-1589.
[171] Y. Matzner, M. Bar-Ner, J. Yahalom, R. Ishai-Michaeli, Z. Fuks and I. Vlodavsky, Degradation of heparan sulfate in the subendothelial extracellular matrix by a readily released heparanase from human neutrophils. Possible role in invasion through basement membranes, J Clin Invest 76 (1985) 1306-1313.
[172] Y. Matzner, I. Vlodavsky, M. Bar-Ner, R. Ishai-Michaeli and A.I. Tauber, Subcellular localization of heparanase in human neutrophils, J Leukoc Biol 51 (1992) 519-524.
[173] J.B. Maxhimer, R.M. Quiros, R. Stewart, K. Dowlatshahi, P. Gattuso, M. Fan, R.A. Prinz and X. Xu, Heparanase-1 expression is associated with the metastatic potential of breast cancer, Surgery 132 (2002) 326-333.
[174] E. McKenzie, K. Tyson, A. Stamps, P. Smith, P. Turner, R. Barry, M. Hircock, S. Patel, E. Barry, C. Stubberfield, J. Terrett and M. Page, Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member, Biochem Biophys Res Commun 276 (2000) 1170-1177.
[175] E. McKenzie, K. Young, M. Hircock, J. Bennett, M. Bhaman, R. Felix, P. Turner, A. Stamps, D. McMillan, G. Saville, S. Ng, S. Mason, D. Snell, D. Schofield, H. Gong, R. Townsend, J. Gallagher, M. Page, R. Parekh and C. Stubberfield, Biochemical characterization of the active heterodimer form of human heparanase (Hpa1) protein expressed in insect cells, Biochem J 373 (2003) 423-435.
[176] H.Q. Miao, E. Navarro, S. Patel, D. Sargent, H. Koo, H. Wan, A. Plata, Q. Zhou, D. Ludwig, P. Bohlen and P. Kussie, Cloning, expression, and purification of mouse heparanase, Protein Expr Purif 26 (2002) 425-431.
[177] M. Minami, Y. Kuraishi and M. Satoh, Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain, Biochem Biophys Res Commun 176 (1991) 593-598.

[178] A. Mittelman, C. Puccio, E. Gafney, N. Coombe, B. Singh, D. Wood, P. Nadler, T. Ahmed and Z. Arlin, A phase I pharmacokinetic study of recombinant human tumor necrosis factor administered by a 5-day continuous infusion, Invest New Drugs 10 (1992) 183-190.
[179] M.L. Monje, H. Toda and T.D. Palmer, Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis, Science 302 (2003) 1760-1765.
[180] M. Moretti, N.D. Sinnappah-Kang, M. Toller, F. Curcio and D. Marchetti, HPSE-1 expression and functionality in differentiating neural cells, J Neurosci Res 83 (2006) 694-701.
[181] J. Nadam, F. Navarro, P. Sanchez, C. Moulin, B. Georges, A. Laglaine, J.M. Pequignot, A. Morales, P. Ryvlin and L. Bezin, Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus, Neurobiol Dis 25 (2007) 412-426.
[182] L. Nadav, A. Eldor, O. Yacoby-Zeevi, E. Zamir, I. Pecker, N. Ilan, B. Geiger, I. Vlodavsky and B.Z. Katz, Activation, processing and trafficking of extracellular heparanase by primary human fibroblasts, J Cell Sci 115 (2002) 2179-2187.
[183] S. Nadeau and S. Rivest, Endotoxemia prevents the cerebral inflammatory wave induced by intraparenchymal lipopolysaccharide injection: role of glucocorticoids and CD14, J Immunol 169 (2002) 3370-3381.
[184] S. Nadeau and S. Rivest, Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia, J Neurosci 20 (2000) 3456-3468.
[185] M.G. Naffah-Mazzacoratti, G.A. Arganaraz, M.A. Porcionatto, F.A. Scorza, D. Amado, R. Silva, M.I. Bellissimo, H.B. Nader and E.A. Cavalheiro, Selective alterations of glycosaminoglycans synthesis and proteoglycan expression in rat cortex and hippocampus in pilocarpine-induced epilepsy, Brain Res Bull 50 (1999) 229-239.
[186] M. Nakajima, T. Irimura, D. Di Ferrante, N. Di Ferrante and G.L. Nicolson, Heparan sulfate degradation: relation to tumor invasive and metastatic properties of mouse B16 melanoma sublines, Science 220 (1983) 611-613.
[187] M. Nakajima, T. Irimura and G.L. Nicolson, Heparanases and tumor metastasis, J Cell Biochem 36 (1988) 157-167.
[188] M. Nakajima, T. Irimura and G.L. Nicolson, Tumor metastasis-associated heparanase (heparan sulfate endoglycosidase) activity in human melanoma cells, Cancer Lett 31 (1986) 277-283.
[189] Y. Naparstek, I.R. Cohen, Z. Fuks and I. Vlodavsky, Activated T lymphocytes produce a matrix-degrading heparan sulphate endoglycosidase, Nature 310 (1984) 241-244.
[190] C. Nardella, A. Lahm, M. Pallaoro, M. Brunetti, A. Vannini and C. Steinkuhler, Mechanism of activation of human heparanase investigated by protein engineering, Biochemistry 43 (2004) 1862-1873.
[191] W.B. Naso, P.L. Perot, Jr. and R.D. Cox, The neuroprotective effect of high-dose methylprednisolone in rat spinal cord hemisection, Neurosci Lett 189 (1995) 176-178.
[192] G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch and Z. Poltorak, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, Faseb J 13 (1999) 9-22.
[193] J. Neumann, M. Gunzer, H.O. Gutzeit, O. Ullrich, K.G. Reymann and K. Dinkel, Microglia provide neuroprotection after ischemia, Faseb J 20 (2006) 714-716.
[194] T.A. Newman, I. Galea, N. van Rooijen and V.H. Perry, Blood-derived dendritic cells in an acute brain injury, J Neuroimmunol 166 (2005) 167-172.
[195] G.L. Nicolson, D.G. Menter, J.L. Herrmann, Z. Yun, P. Cavanaugh and D. Marchetti, Brain metastasis: role of trophic, autocrine, and paracrine factors in tumor invasion and colonization of the central nervous system, Curr Top Microbiol Immunol 213 (Pt 2) (1996) 89-115.
[196] H.G. Niessen, F. Angenstein, S. Vielhaber, C. Frisch, A. Kudin, C.E. Elger, H.J. Heinze, H. Scheich and W.S. Kunz, Volumetric magnetic resonance imaging of

functionally relevant structural alterations in chronic epilepsy after pilocarpine-induced status epilepticus in rats, Epilepsia 46 (2005) 1021-1026.
[197] A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff and F. Helmchen, Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo, Science 308 (2005) 1314-1318.
[198] T. Nobuhisa, Y. Naomoto, T. Okawa, M. Takaoka, M. Gunduz, T. Motoki, H. Nagatsuka, H. Tsujigiwa, Y. Shirakawa, T. Yamatsuji, M. Haisa, J. Matsuoka, J. Kurebayashi, M. Nakajima, S. Taniguchi, J. Sagara, J. Dong and N. Tanaka, Translocation of heparanase into nucleus results in cell differentiation, Cancer Sci (2007).
[199] T. Nobuhisa, Y. Naomoto, M. Takaoka, Y. Tabuchi, K. Ookawa, D. Kitamoto, E. Gunduz, M. Gunduz, H. Nagatsuka, M. Haisa, J. Matsuoka, M. Nakajima and N. Tanaka, Emergence of nuclear heparanase induces differentiation of human mammary cancer cells, Biochem Biophys Res Commun 331 (2005) 175-180.
[200] T. Ohkawa, Y. Naomoto, M. Takaoka, T. Nobuhisa, K. Noma, T. Motoki, T. Murata, H. Uetsuka, M. Kobayashi, Y. Shirakawa, T. Yamatsuji, N. Matsubara, J. Matsuoka, M. Haisa, M. Gunduz, H. Tsujigiwa, H. Nagatsuka, M. Hosokawa, M. Nakajima and N. Tanaka, Localization of heparanase in esophageal cancer cells: respective roles in prognosis and differentiation, Lab Invest 84 (2004) 1289-1304.
[201] K. Ono, T. Takii, K. Onozaki, M. Ikawa, M. Okabe and M. Sawada, Migration of exogenous immature hematopoietic cells into adult mouse brain parenchyma under GFP-expressing bone marrow chimera, Biochem Biophys Res Commun 262 (1999) 610-614.
[202] G.M. Oosta, L.V. Favreau, D.L. Beeler and R.D. Rosenberg, Purification and properties of human platelet heparitinase, J Biol Chem 257 (1982) 11249-11255.
[203] M. Oprica, S.D. Spulber, A.F. Aronsson, C. Post, B. Winblad and M. Schultzberg, The influence of kainic acid on core temperature and cytokine levels in the brain, Cytokine 35 (2006) 77-87.
[204] D.M. Ornitz and P. Leder, Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3, J Biol Chem 267 (1992) 16305-16311.
[205] L.S. Overstreet-Wadiche, D.A. Bromberg, A.L. Bensen and G.L. Westbrook, Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells, J Neurosci 26 (2006) 4095-4103.
[206] C. Ozkara, M. Uzan, T. Tanriverdi, O. Baykara, B. Ekinci, N. Yeni, A. Kafadar and N. Buyru, Lack of association between IL-1beta/alpha gene polymorphisms and temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, Seizure 15 (2006) 288-291.
[207] P.K. Panegyres and J. Hughes, The neuroprotective effects of the recombinant interleukin-1 receptor antagonist rhIL-1ra after excitotoxic stimulation with kainic acid and its relationship to the amyloid precursor protein gene, J Neurol Sci 154 (1998) 123-132.
[208] J.M. Parent, T.W. Yu, R.T. Leibowitz, D.H. Geschwind, R.S. Sloviter and D.H. Lowenstein, Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus, J Neurosci 17 (1997) 3727-3738.
[209] C.R. Parish, The role of heparan sulphate in inflammation, Nat Rev Immunol 6 (2006) 633-643.
[210] C.R. Parish, C. Freeman, K.J. Brown, D.J. Francis and W.B. Cowden, Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity, Cancer Res 59 (1999) 3433-3441.
[211] C.R. Parish, C. Freeman and M.D. Hulett, Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion, Biochim Biophys Acta 1471 (2001) M99-108.
[212] J.E. Park, G.A. Keller and N. Ferrara, The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF, Mol Biol Cell 4 (1993) 1317-1326.

[213] J. Peltola, T. Keranen, S. Rainesalo and M. Hurme, Polymorphism of the interleukin-1 gene complex in localization-related epilepsy, Ann Neurol 50 (2001) 275-276.
[214] J. Peltola, J. Laaksonen, A.M. Haapala, M. Hurme, S. Rainesalo and T. Keranen, Indicators of inflammation after recent tonic-clonic epileptic seizures correlate with plasma interleukin-6 levels, Seizure 11 (2002) 44-46.
[215] M. Penkowa, A. Molinero, J. Carrasco and J. Hidalgo, Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures, Neuroscience 102 (2001) 805-818.
[216] D. Pennica, G.E. Nedwin, J.S. Hayflick, P.H. Seeburg, R. Derynck, M.A. Palladino, W.J. Kohr, B.B. Aggarwal and D.V. Goeddel, Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin, Nature 312 (1984) 724-729.
[217] N. Perrimon and M. Bernfield, Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes, Nature 404 (2000) 725-728.
[218] D.S. Pikas, J.P. Li, I. Vlodavsky and U. Lindahl, Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets, J Biol Chem 273 (1998) 18770-18777.
[219] A. Pitkanen, I. Kharatishvili, H. Karhunen, K. Lukasiuk, R. Immonen, J. Nairismagi, O. Grohn and J. Nissinen, Epileptogenesis in experimental models, Epilepsia 48 Suppl 2 (2007) 13-20.
[220] A. Pitkanen and T.K. McIntosh, Animal models of post-traumatic epilepsy, J Neurotrauma 23 (2006) 241-261.
[221] A. Pitkanen, J. Nissinen, J. Nairismagi, K. Lukasiuk, O.H. Grohn, R. Miettinen and R. Kauppinen, Progression of neuronal damage after status epilepticus and during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy, Prog Brain Res 135 (2002) 67-83.
[222] K.H. Plate, Mechanisms of angiogenesis in the brain, J Neuropathol Exp Neurol 58 (1999) 313-320.
[223] K.H. Plate, G. Breier, H.A. Weich and W. Risau, Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo, Nature 359 (1992) 845-848.
[224] V.A. Ploplis, E.L. French, P. Carmeliet, D. Collen and E.F. Plow, Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice, Blood 91 (1998) 2005-2009.
[225] J.L. Poirier, R. Capek and Y. De Koninck, Differential progression of Dark Neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus, Neuroscience 97 (2000) 59-68.
[226] M. Presta, P. Dell'Era, S. Mitola, E. Moroni, R. Ronca and M. Rusnati, Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis, Cytokine Growth Factor Rev 16 (2005) 159-178.
[227] E.A. Proper, A.B. Oestreicher, G.H. Jansen, C.W. Veelen, P.C. van Rijen, W.H. Gispen and P.N. de Graan, Immunohistochemical characterization of mossy fibre sprouting in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy, Brain 123 (Pt 1) (2000) 19-30.
[228] Z. Qian, M.E. Gilbert, M.A. Colicos, E.R. Kandel and D. Kuhl, Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation, Nature 361 (1993) 453-457.
[229] D.L. Rabenstein, Heparin and heparan sulfate: structure and function, Nat Prod Rep 19 (2002) 312-331.
[230] A.C. Rapraeger, A. Krufka and B.B. Olwin, Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation, Science 252 (1991) 1705-1708.
[231] U. Rauch, P. Gao, A. Janetzko, A. Flaccus, L. Hilgenberg, H. Tekotte, R.K. Margolis and R.U. Margolis, Isolation and characterization of developmentally regulated

chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of brain identified with monoclonal antibodies, J Biol Chem 266 (1991) 14785-14801.
[232] T. Ravizza and A. Vezzani, Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system, Neuroscience 137 (2006) 301-308.
[233] B.G. Redman, Y. Abubakr, T. Chou, P. Esper and L.E. Flaherty, Phase II trial of recombinant interleukin-1 beta in patients with metastatic renal cell carcinoma, J Immunother Emphasis Tumor Immunol 16 (1994) 211-215.
[234] B. Reuss and O. von Bohlen und Halbach, Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system, Cell Tissue Res 313 (2003) 139-157.
[235] T.P. Richardson, V. Trinkaus-Randall and M.A. Nugent, Regulation of heparan sulfate proteoglycan nuclear localization by fibronectin, J Cell Sci 114 (2001) 1613-1623.
[236] W. Ricoveri and R. Cappelletti, Heparan sulfate endoglycosidase and metastatic potential in murine fibrosarcoma and melanoma, Cancer Res 46 (1986) 3855-3861.
[237] S. Rivest, Molecular insights on the cerebral innate immune system, Brain Behav Immun 17 (2003) 13-19.
[238] C. Roch, C. Leroy, A. Nehlig and I.J. Namer, Magnetic resonance imaging in the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats, Epilepsia 43 (2002) 325-335.
[239] S. Rose-John, J. Scheller, G. Elson and S.A. Jones, Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer, J Leukoc Biol 80 (2006) 227-236.
[240] D.R. Rosell, J. Nacher, K.T. Akama and B.S. McEwen, Spatiotemporal distribution of gp130 cytokines and their receptors after status epilepticus: comparison with neuronal degeneration and microglial activation, Neuroscience 122 (2003) 329-348.
[241] S. Roshy, B.F. Sloane and K. Moin, Pericellular cathepsin B and malignant progression, Cancer Metastasis Rev 22 (2003) 271-286.
[242] N.J. Rothwell and G.N. Luheshi, Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target, Trends Neurosci 23 (2000) 618-625.
[243] H.K. Rucker, H.J. Wynder and W.E. Thomas, Cellular mechanisms of CNS pericytes, Brain Res Bull 51 (2000) 363-369.
[244] E. Ruoslahti, Brain extracellular matrix, Glycobiology 6 (1996) 489-492.
[245] H. Samland, S. Huitron-Resendiz, E. Masliah, J. Criado, S.J. Henriksen and I.L. Campbell, Profound increase in sensitivity to glutamatergic- but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6, J Neurosci Res 73 (2003) 176-187.
[246] A.P. Sappino, R. Madani, J. Huarte, D. Belin, J.Z. Kiss, A. Wohlwend and J.D. Vassalli, Extracellular proteolysis in the adult murine brain, J Clin Invest 92 (1993) 679-685.
[247] N. Sasaki, N. Higashi, T. Taka, M. Nakajima and T. Irimura, Cell surface localization of heparanase on macrophages regulates degradation of extracellular matrix heparan sulfate, J Immunol 172 (2004) 3830-3835.
[248] T. Sato, A. Yamaguchi, T. Goi, Y. Hirono, K. Takeuchi, K. Katayama and S. Matsukawa, Heparanase expression in human colorectal cancer and its relationship to tumor angiogenesis, hematogenous metastasis, and prognosis, J Surg Oncol 87 (2004) 174-181.
[249] N. Savion, M.H. Disatnik and Z. Nevo, Murine macrophage heparanase: inhibition and comparison with metastatic tumor cells, J Cell Physiol 130 (1987) 77-84.
[250] N. Savion, I. Vlodavsky and Z. Fuks, Interaction of T lymphocytes and macrophages with cultured vascular endothelial cells: attachment, invasion, and subsequent degradation of the subendothelial extracellular matrix, J Cell Physiol 118 (1984) 169-178.

[251] M. Sayyah, S. Beheshti, M.A. Shokrgozar, A. Eslami-far, Z. Deljoo, A.R. Khabiri and A. Haeri Rohani, Antiepileptogenic and anticonvulsant activity of interleukin-1 beta in amygdala-kindled rats, Exp Neurol 191 (2005) 145-153.
[252] J. Scheller and S. Rose-John, Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside, Med Microbiol Immunol (Berl) 195 (2006) 173-183.
[253] L.C. Schmued and K.J. Hopkins, Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration, Brain Res 874 (2000) 123-130.
[254] B. Schobitz, E.R. de Kloet, W. Sutanto and F. Holsboer, Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain, Eur J Neurosci 5 (1993) 1426-1435.
[255] S.Y. Schubert, N. Ilan, M. Shushy, O. Ben-Izhak, I. Vlodavsky and O. Goldshmidt, Human heparanase nuclear localization and enzymatic activity, Lab Invest 84 (2004) 535-544.
[256] N. Schwartz, Biosynthesis and regulation of expression of proteoglycans, Front Biosci 5 (2000) D649-655.
[257] S.B. Selleck, Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics, Trends Genet 16 (2000) 206-212.
[258] F. Semah, M.C. Picot, C. Adam, D. Broglin, A. Arzimanoglou, B. Bazin, D. Cavalcanti and M. Baulac, Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence?, Neurology 51 (1998) 1256-1262.
[259] R.F. Sewell, P.E. Brenchley and N.P. Mallick, Human mononuclear cells contain an endoglycosidase specific for heparan sulphate glycosaminoglycan demonstrable with the use of a specific solid-phase metabolically radiolabelled substrate, Biochem J 264 (1989) 777-783.
[260] I. Shafat, I. Vlodavsky and N. Ilan, Characterization of mechanisms involved in secretion of active heparanase, J Biol Chem 281 (2006) 23804-23811.
[261] A.A. Shandra, L.S. Godlevsky, R.S. Vastyanov, A.A. Oleinik, V.L. Konovalenko, E.N. Rapoport and N.N. Korobka, The role of TNF-alpha in amygdala kindled rats, Neurosci Res 42 (2002) 147-153.
[262] J.J. Sheehan, C. Zhou, I. Gravanis, A.D. Rogove, Y.P. Wu, D.F. Bogenhagen and S.E. Tsirka, Proteolytic activation of monocyte chemoattractant protein-1 by plasmin underlies excitotoxic neurodegeneration in mice, J Neurosci 27 (2007) 1738-1745.
[263] K. Shimada and T. Ozawa, Subendothelial extracellular-matrix heparan sulfate proteoglycan-degrading activity of human monocyte macrophages, Heart Vessels 3 (1987) 175-181.
[264] T. Shirai, H. Yamaguchi, H. Ito, C.W. Todd and R.B. Wallace, Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for human tumour necrosis factor, Nature 313 (1985) 803-806.
[265] E. Shohami, I. Ginis and J.M. Hallenbeck, Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury, Cytokine Growth Factor Rev 10 (1999) 119-130.
[266] A.R. Simard and S. Rivest, Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia, Faseb J 18 (2004) 998-1000.
[267] A.R. Simard and S. Rivest, Neuroprotective properties of the innate immune system and bone marrow stem cells in Alzheimer's disease, Mol Psychiatry 11 (2006) 327-335.
[268] A.R. Simard and S. Rivest, Role of inflammation in the neurobiology of stem cells, Neuroreport 15 (2004) 2305-2310.
[269] R.S. Sloviter, The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge, C R Biol 328 (2005) 143-153.
[270] R.S. Sloviter, Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy, Hippocampus 1 (1991) 41-66.

[271] R.S. Sloviter, H.S. Kudrimoti, K.D. Laxer, N.M. Barbaro, S. Chan, L.J. Hirsch, R.R. Goodman and T.A. Pedley, "Tectonic" hippocampal malformations in patients with temporal lobe epilepsy, Epilepsy Res 59 (2004) 123-153.
[272] S.F. Sorrells and R.M. Sapolsky, An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS, Brain Behav Immun 21 (2007) 259-272.
[273] I. Sotnikov, R. Hershkoviz, V. Grabovsky, N. Ilan, L. Cahalon, I. Vlodavsky, R. Alon and O. Lider, Enzymatically quiescent heparanase augments T cell interactions with VCAM-1 and extracellular matrix components under versatile dynamic contexts, J Immunol 172 (2004) 5185-5193.
[274] G.V. Sperinde and M.A. Nugent, Heparan sulfate proteoglycans control intracellular processing of bFGF in vascular smooth muscle cells, Biochemistry 37 (1998) 13153-13164.
[275] G.V. Sperinde and M.A. Nugent, Mechanisms of fibroblast growth factor 2 intracellular processing: a kinetic analysis of the role of heparan sulfate proteoglycans, Biochemistry 39 (2000) 3788-3796.
[276] M.D. Sternlicht and Z. Werb, How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, Annu Rev Cell Dev Biol 17 (2001) 463-516.
[277] G. Stoll, S. Jander and M. Schroeter, Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions, Prog Neurobiol 56 (1998) 149-171.
[278] W.J. Streit, S.A. Walter and N.A. Pennell, Reactive microgliosis, Prog Neurobiol 57 (1999) 563-581.
[279] A. Szklarczyk, J. Lapinska, M. Rylski, R.D. McKay and L. Kaczmarek, Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus, J Neurosci 22 (2002) 920-930.
[280] H. Takahashi, H. Matsumoto, Y. Kumon, T. Ohnishi, C. Freeman, Y. Imai and J. Tanaka, Expression of heparanase in nestin-positive reactive astrocytes in ischemic lesions of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion, Neurosci Lett 417 (2007) 250-254.
[281] M. Takaoka, Y. Naomoto, T. Ohkawa, H. Uetsuka, Y. Shirakawa, F. Uno, T. Fujiwara, M. Gunduz, H. Nagatsuka, M. Nakajima, N. Tanaka and M. Haisa, Heparanase expression correlates with invasion and poor prognosis in gastric cancers, Lab Invest 83 (2003) 613-622.
[282] W. Tang, Y. Nakamura, M. Tsujimoto, M. Sato, X. Wang, K. Kurozumi, M. Nakahara, K. Nakao, M. Nakamura, I. Mori and K. Kakudo, Heparanase: a key enzyme in invasion and metastasis of gastric carcinoma, Mod Pathol 15 (2002) 593-598.
[283] J.L. Tchelingerian, M. Monge, F. Le Saux, B. Zalc and C. Jacque, Differential oligodendroglial expression of the tumor necrosis factor receptors in vivo and in vitro, J Neurochem 65 (1995) 2377-2380.
[284] M. Thom, J. Zhou, L. Martinian and S. Sisodiya, Quantitative post-mortem study of the hippocampus in chronic epilepsy: seizures do not inevitably cause neuronal loss, Brain 128 (2005) 1344-1357.
[285] W.E. Thomas, Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells, Brain Res Brain Res Rev 31 (1999) 42-57.
[286] N. Tilgen, H. Pfeiffer, J. Cobilanschi, B. Rau, S. Horvath, C.E. Elger, P. Propping and A. Heils, Association analysis between the human interleukin 1beta (-511) gene polymorphism and susceptibility to febrile convulsions, Neurosci Lett 334 (2002) 68-70.
[287] R. Timpl, Proteoglycans of basement membranes, Experientia 49 (1993) 417-428.
[288] M. Toyoshima and M. Nakajima, Human heparanase. Purification, characterization, cloning, and expression, J Biol Chem 274 (1999) 24153-24160.
[289] F.J. Tsai, Y.Y. Hsieh, C.C. Chang, C.C. Lin and C.H. Tsai, Polymorphisms for interleukin 1 beta exon 5 and interleukin 1 receptor antagonist in Taiwanese children with febrile convulsions, Arch Pediatr Adolesc Med 156 (2002) 545-548.

[290] S.E. Tsirka, A. Gualandris, D.G. Amaral and S. Strickland, Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator, Nature 377 (1995) 340-344.
[291] S.E. Tsirka, A.D. Rogove, T.H. Bugge, J.L. Degen and S. Strickland, An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus, J Neurosci 17 (1997) 543-552.
[292] S. Tumova, B.A. Hatch, D.J. Law and K.J. Bame, Basic fibroblast growth factor does not prevent heparan sulphate proteoglycan catabolism in intact cells, but it alters the distribution of the glycosaminoglycan degradation products, Biochem J 337 (Pt 3) (1999) 471-481.
[293] N.P. Turrin and S. Rivest, Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy, Neurobiol Dis 16 (2004) 321-334.
[294] E.E. Ubogu, M.B. Cossoy and R.M. Ransohoff, The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation, Trends Pharmacol Sci 27 (2006) 48-55.
[295] F. Uno, T. Fujiwara, Y. Takata, S. Ohtani, K. Katsuda, M. Takaoka, T. Ohkawa, Y. Naomoto, M. Nakajima and N. Tanaka, Antisense-mediated suppression of human heparanase gene expression inhibits pleural dissemination of human cancer cells, Cancer Res 61 (2001) 7855-7860.
[296] G.G. Vaday and O. Lider, Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation, J Leukoc Biol 67 (2000) 149-159.
[297] L. Vallieres and P.E. Sawchenko, Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity, J Neurosci 23 (2003) 5197-5207.
[298] J. van den Born and J.H. Berden, Is microalbuminuria in diabetes due to changes in glomerular heparan sulphate?, Nephrol Dial Transplant 10 (1995) 1277-1279.
[299] M.J. van den Hoven, A.L. Rops, M.A. Bakker, J. Aten, N. Rutjes, P. Roestenberg, R. Goldschmeding, E. Zcharia, I. Vlodavsky, J. van der Vlag and J.H. Berden, Increased expression of heparanase in overt diabetic nephropathy, Kidney Int 70 (2006) 2100-2108.
[300] N.J. Van Wagoner and E.N. Benveniste, Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes, J Neuroimmunol 100 (1999) 124-139.
[301] A. Vezzani and T.Z. Baram, New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy, Epilepsy Curr 7 (2007) 45-50.
[302] A. Vezzani, M. Conti, A. De Luigi, T. Ravizza, D. Moneta, F. Marchesi and M.G. De Simoni, Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures, J Neurosci 19 (1999) 5054-5065.
[303] A. Vezzani, D. Moneta, M. Conti, C. Richichi, T. Ravizza, A. De Luigi, M.G. De Simoni, G. Sperk, S. Andell-Jonsson, J. Lundkvist, K. Iverfeldt and T. Bartfai, Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice, Proc Natl Acad Sci U S A 97 (2000) 11534-11539.
[304] A. Vezzani, D. Moneta, C. Richichi, M. Aliprandi, S.J. Burrows, T. Ravizza, C. Perego and M.G. De Simoni, Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis, Epilepsia 43 Suppl 5 (2002) 30-35.
[305] M. Virta, M. Hurme and M. Helminen, Increased frequency of interleukin-1beta (-511) allele 2 in febrile seizures, Pediatr Neurol 26 (2002) 192-195.
[306] L. Vitkovic, J. Bockaert and C. Jacque, "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain?, J Neurochem 74 (2000) 457-471.
[307] I. Vlodavsky, M. Elkin, O. Pappo, H. Aingorn, R. Atzmon, R. Ishai-Michaeli, A. Aviv, I. Pecker and Y. Friedmann, Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis, Isr Med Assoc J 2 Suppl (2000) 37-45.

[308] I. Vlodavsky and Y. Friedmann, Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis, J Clin Invest 108 (2001) 341-347.
[309] I. Vlodavsky, Y. Friedmann, M. Elkin, H. Aingorn, R. Atzmon, R. Ishai-Michaeli, M. Bitan, O. Pappo, T. Peretz, I. Michal, L. Spector and I. Pecker, Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis, Nat Med 5 (1999) 793-802.
[310] I. Vlodavsky and O. Goldshmidt, Properties and function of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis, Haemostasis 31 Suppl 1 (2001) 60-63.
[311] I. Vlodavsky, G. Korner, R. Ishai-Michaeli, P. Bashkin, R. Bar-Shavit and Z. Fuks, Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis, Cancer Metastasis Rev 9 (1990) 203-226.
[312] B. Voutsinos-Porche, E. Koning, H. Kaplan, A. Ferrandon, M. Guenounou, A. Nehlig and J. Motte, Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, Neurobiol Dis 17 (2004) 385-402.
[313] V. Vreys, N. Delande, Z. Zhang, C. Coomans, A. Roebroek, J. Durr and G. David, Cellular uptake of mammalian heparanase precursor involves low density lipoprotein receptor-related proteins, mannose 6-phosphate receptors, and heparan sulfate proteoglycans, J Biol Chem 280 (2005) 33141-33148.
[314] H. Wajant, K. Pfizenmaier and P. Scheurich, Tumor necrosis factor signaling, Cell Death Differ 10 (2003) 45-65.
[315] S. Walter, A. Doering, M. Letiembre, Y. Liu, W. Hao, R. Diem, C. Bernreuther, M. Glatzel, B. Engelhardt and K. Fassbender, The LPS receptor, CD14, in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis, Cell Physiol Biochem 17 (2006) 167-172.
[316] C.X. Wang and A. Shuaib, Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury, Prog Neurobiol 67 (2002) 161-172.
[317] L. Wang, M. Fuster, P. Sriramarao and J.D. Esko, Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses, Nat Immunol 6 (2005) 902-910.
[318] Q. Wang, X.N. Tang and M.A. Yenari, The inflammatory response in stroke, J Neuroimmunol 184 (2007) 53-68.
[319] A. Wasteson, M. Hook and B. Westermark, Demonstration of a platelet enzyme, degrading heparan sulphate, FEBS Lett 64 (1976) 218-221.
[320] K. Williams, X. Alvarez and A.A. Lackner, Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system, Glia 36 (2001) 156-164.
[321] S.G. Wilt, E. Milward, J.M. Zhou, K. Nagasato, H. Patton, R. Rusten, D.E. Griffin, M. O'Connor and M. Dubois-Dalcq, In vitro evidence for a dual role of tumor necrosis factor-alpha in human immunodeficiency virus type 1 encephalopathy, Ann Neurol 37 (1995) 381-394.
[322] M. Wirenfeldt, A.A. Babcock, R. Ladeby, K.L. Lambertsen, F. Dagnaes-Hansen, R.G. Leslie, T. Owens and B. Finsen, Reactive microgliosis engages distinct responses by microglial subpopulations after minor central nervous system injury, J Neurosci Res 82 (2005) 507-514.
[323] O.T. Wolf, V. Dyakin, A. Patel, C. Vadasz, M.J. de Leon, B.S. McEwen and K. Bulloch, Volumetric structural magnetic resonance imaging (MRI) of the rat hippocampus following kainic acid (KA) treatment, Brain Res 934 (2002) 87-96.
[324] T. Yabe, T. Hata, J. He and N. Maeda, Developmental and regional expression of heparan sulfate sulfotransferase genes in the mouse brain, Glycobiology 15 (2005) 982-993.
[325] J. Yahalom, E. Fibach, R. Bar-Tana, Z. Fuks and I. Vlodavsky, Differentiating human leukemia cells express heparanase that degrades heparan sulfate in subendothelial extracellular matrix, Leuk Res 12 (1988) 711-717.

[326] Y. Yamaguchi, Heparan sulfate proteoglycans in the nervous system: their diverse roles in neurogenesis, axon guidance, and synaptogenesis, Semin Cell Dev Biol 12 (2001) 99-106.
[327] M. Yanagishita and V.C. Hascall, Cell surface heparan sulfate proteoglycans, J Biol Chem 267 (1992) 9451-9454.
[328] Y. Yang, V. Macleod, M. Bendre, Y. Huang, A.M. Theus, H.Q. Miao, P. Kussie, S. Yaccoby, J. Epstein, L.J. Suva, T. Kelly and R.D. Sanderson, Heparanase promotes the spontaneous metastasis of myeloma cells to bone, Blood 105 (2005) 1303-1309.
[329] A. Yayon, M. Klagsbrun, J.D. Esko, P. Leder and D.M. Ornitz, Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor, Cell 64 (1991) 841-848.
[330] M. Yepes, M. Sandkvist, M.K. Wong, T.A. Coleman, E. Smith, S.L. Cohan and D.A. Lawrence, Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis, Blood 96 (2000) 569-576.
[331] K. Yoshida and F.H. Gage, Cooperative regulation of nerve growth factor synthesis and secretion in fibroblasts and astrocytes by fibroblast growth factor and other cytokines, Brain Res 569 (1992) 14-25.
[332] E. Zcharia, S. Metzger, T. Chajek-Shaul, H. Aingorn, M. Elkin, Y. Friedmann, T. Weinstein, J.P. Li, U. Lindahl and I. Vlodavsky, Transgenic expression of mammalian heparanase uncovers physiological functions of heparan sulfate in tissue morphogenesis, vascularization, and feeding behavior, Faseb J 18 (2004) 252-263.
[333] A. Zetser, F. Levy-Adam, V. Kaplan, S. Gingis-Velitski, Y. Bashenko, S. Schubert, M.Y. Flugelman, I. Vlodavsky and N. Ilan, Processing and activation of latent heparanase occurs in lysosomes, J Cell Sci 117 (2004) 2249-2258.
[334] Y. Zhang, L. Li, Y. Wang, J. Zhang, G. Wei, Y. Sun and F. Shen, Downregulating the expression of heparanase inhibits the invasion, angiogenesis and metastasis of human hepatocellular carcinoma, Biochem Biophys Res Commun (2007).
[335] Y. Zhang, M.N. Yeung, J. Liu, C.H. Chau, Y.S. Chan and D.K. Shum, Mapping heparanase expression in the spinal cord of adult rats, J Comp Neurol 494 (2006) 345-357.
[336] Z.H. Zhang, Y. Chen, H.J. Zhao, C.Y. Xie, J. Ding and Y.T. Hou, Silencing of Heparanase by siRNA Inhibits Tumor Metastasis and Angiogenesis of Human Breast Cancer In Vitro and In Vivo, Cancer Biol Ther 6 (2007).

La pharmaco-résistance des épilepsies du lobe temporal serait étroitement liée à une perte de neurones dans l'hippocampe qui pourrait résulter d'une inflammation. Chez le rat soumis à une épileptogenèse expérimentale, nous avons caractérisé la réponse inflammatoire de l'hippocampe. Celle-ci précède la mise en place de la neurodégénérescence et consiste en une forte production de cytokines pro-inflammatoires par la microglie activée ainsi qu'en une infiltration de monocytes/ macrophages. La progression des monocytes dans le parenchyme cérébral serait facilitée par la dégradation des chaînes de sulfate d'héparane qu'ils portent à leur surface, sous l'action de l'héparanase, spécifiquement exprimée par les neurones. Il se pourrait que le blocage des sites de liaison de l'héparanase aux chaînes de sulfate d'héparane réduise l'infiltration cérébrale des monocytes, et permette de prévenir la dégénérescence neuronale associée aux épilepsies.

MOTS-CLES : cytokines, épilepsie, héparanase, hippocampe, macrophages, microglie, monocytes.

Intractable temporal lobe epilepsy may be consecutive to the loss of neurons in the hippocampus. In this brain area, neurodegeneration may be induced by inflammatory processes. Using a rat model of epileptogenesis, we characterized the inflammatory response in the hippocampus, that we show to precede neurodegeneration. We evidenced a high induction of proinflammatory cytokine concentration, mainly in cells corresponding to activated microglia and to monocytes which infiltrated the hippocampal parenchyma. Degradation of heparan sulfate chains present at the surface of monocytes by neuronal heparanase may promote their progression in the brain parenchyma. Blockade of the linkage site of heparanase on heparan sulfate chains could reduce brain infiltration of monocytes and then prevent neurodegeneration associated to epilepsy.

KEYWORDS : cytokine, epilepsy, heparanase, hippocampus, macrophages, microglia, monocytes.

DISCIPLINE : PHYSIOLOGIE & NEUROSCIENCES

Laboratoire de Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire
UMR5123 CNRS et UCBL
Campus de la Doua – 43 boulevard du 11 novembre 1918 – 69100 Villeurbanne