HAL open science

Angiogenèse: Nouvelle cible thérapeutique pour les épilepsies partielles pharmacorésitantes

Mélanie Morin-Brureau

To cite this version:

Mélanie Morin-Brureau. Angiogenèse: Nouvelle cible thérapeutique pour les épilepsies partielles pharmacorésitantes. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Montpellier I, 2009. Français. NNT : . tel-00421314

HAL Id: tel-00421314

https://theses.hal.science/tel-00421314

Submitted on 3 Feb 2010

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.

UNIVERSITE MONTPELLIER I

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

Doctorat

Neurosciences

Mélanie Morin

Angiogenèse : Nouvelle cible thérapeutique pour les épilepsies partielles pharmacorésistantes

Thèse dirigée par le Dr Mireille Lerner-Natoli

Soutenue le 23 juin 2009

Jury

Professeur Joël Bockaert	Président
Docteur Maria Grazia De Simoni	Rapporteur
Professeur Andreas Bikfalvi	Rapporteur
Professeur Philippe Coubes	Examinateur
Docteur Mireille Lerner-Natoli	Directrice de thèse

Je tiens avant toute chose à témoigner ma reconnaissance au Docteur Maria Grazia De Simoni et au Professeur Andréas Bikfalvi pour avoir accepté d'évaluer ma thèse.
Je remercie doublement le Professeur Philippe Coubes, pour sa contribution active à ce travail par l'apport des pièces d'exérèse, et pour sa présence à ce jury.
J'exprime ma gratitude au professeur Joël Bockaert, pour sa disponibilité tout au long de ce projet, pour m'avoir guidée, dans l'écriture des articles et pour les discussions, toujours riches d'enseignement. Merci de présider mon jury de thèse.

Mireille,
Il y a maintenant six ans que nous avons fait connaissance et je voulais dans un premier temps te remercier du soutien que tu m'as apporté lors de ces dernières années et surtout celle-ci.
Tout au long de ce projet tu m'as laissé une grande liberté. Ainsi, j'ai pu acquérir l'autonomie et l'organisation d'un travail de recherche, atouts indispensables à ma réussite après ce doctorat.
Merci pour ta présence et surtout, ta très grande disponibilité à chaque moment où j'ai eu besoin de tes conseils : un souci, on t'appelle et tout repart !
Merci pour la confiance que tu m'as donnée tout au long de ces années dans les congrès, les réunions mais aussi dans l'encadrement des étudiants.
Le travail de ces 4 années de thèse auprès de toi a été un grand bonheur et j'espère bien que l'on pourra continuer à travailler ensemble dans les années qui suivent. Merci !

Marie-Claude,
Dès mon arrivée en stage de Master 1, tu m'as encadrée avec enthousiasme et bonne humeur et tu as toujours été présente pour m'apprendre tes techniques.
Puis, pendant le doctorat, tu as toujours été prête à m'aider dans les moments où le temps manque ! Merci de t'impliquer autant dans nos travaux de recherche.

Fred,
Sans tes mains en or, ces cultures organotypiques n'auraient pas fait d'aussi beaux vaisseaux sanguins ! Merci beaucoup de ton aide dans toutes ces manips.
Mais aussi je voulais te remercier pour les discussions, les critiques que tu as apporté sur ce travail de thèse et de ton aide pour le papier.
Et puis merci pour ton aide hors du travail, de ta générosité et notamment pour les petits problèmes de mécaniques.

Valérie,
Je voudrais te remercier de m'avoir incorporée dans le travail sur les tissus humains, qui a permis de faire ensemble ce joli papier, et de contribuer aux projets en cours, en apportant tes idées et tes connaissances en neuropathologie..

Zuzanna,
Tu es arrivée récemment dans l'équipe et j'espère qu'en continuant les études sur le tissu humain nous aurons l'occasion de travailler ensemble. En tout cas, j'apprécie ta bonne humeur et je souhaite que tu m'apprennes le polonais un de ces jours !

J'aimerais dire un grand « grazie mille » à Federica Bertaso pour son aide en anglais et sa relecture attentive des articles. Merci pour ton enthousiasme perpétuel et ta bonne humeur.

Merci aussi à Arielle Crespel pour son aide lors des études sur le tissu humain.

Merci à Laurent Fagni de m'avoir accueillie dans son équipe, pour son aide à la relecture des articles et ses critiques constructives pendant les réunions.

Enfin merci à toute l'équipe « Physiopathologie de la transmission synaptique » pour vos discussions qui ont permis de faire avancer ce projet.

Et non je ne t'ai pas oubliée, Aurore !!! Mais ta place est maintenant du côté des amis ! Tu es arrivé au labo pour ton stage de M2 sous les conseils de mon homme. Je t'ai tout d'abord encadrée puis petit à petit « coachée » dans le projet M2 puis hum… ange gardien c'est ça ?? En tout maintenant tu es une amie sur laquelle je peux compter. Merci pour tes moments d'écoute, de réconfort, de soirées filles ou pas filles…. Merci pour cette amitié et d'être à ton tour mon ange gardien cette année ! L'année prochaine je reprends mon rôle, promis !!

Véro, merci pour ton appui dans cette fin de thèse, tes conseils et surtout ta grande générosité. Tu dis souvent que tout le monde se confie à toi mais tu es quelqu'un d'attentionné et d'une grande écoute… J'ai dû en abuser cette année !
Brigitte, euh… là je ne compte pas les années parce que je vais prendre un coup de vieux ! Bon j'ose, depuis le CM1 c'est ça donc ….. ans !! Ah oui quand même. On a partagé des moments

vraiment géniaux toute les deux. J'espère que notre amitié continuera. En tout cas merci pour toutes ces années !

Enfin je voulais remercier les amis qui ont été à un moment ou un autre un soutien : Dany, Guillaume & Marie-Claire (et le petit Raphaël), Aurélien, Maxime, Stephanie, Mihayl & Jess (et la petite Lilia), Maha.

Merci à mon chéri pour son éternel soutien dans les moments de grosse perte de confiance, de doutes et je sais que ça n'a pas été facile. Merci pour ton réconfort, ta présence et surtout ta patience ces derniers mois. Mais ne t'inquiète pas, tu pourras te venger l'année prochaine !! Merci pour la ressource que tu m'apportes tous les jours et pour la confiance que tu m'accordes.

Merci à ma famille pour avoir toujours cru en moi et plus particulièrement mes parents. Petite sœur merci pour tout et dans 5 ans tu seras peut-être à ma place en train de rédiger ta thèse ???

Je voudrais terminer ces remerciements en ayant une petite pensée pour mon grand-père. Même si tu n'es pas là physiquement tu m'as donné la force de continuer. Je te dédicace cette thèse car je sais que tu aurais été très heureux d'être là et fier de ta petite fille. Tu nous manques.

TITRE

Angiogenèse : une nouvelle cible thérapeutique pour les épilepsies pharmaco-résistantes.

RESUME

Dans l'épilepsie du lobe temporal (ELT), l'hyperexcitabilité est attribuée à la mort neuronale, la gliose et la plasticité synaptique. Un remodelage vasculaire n'a jamais été recherché dans le tissu épileptique, bien que des données récentes suggèrent que la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est épileptogène.

Nous avons observé dans l'hippocampe de patients atteints d'ELT réfractaire une dégradation de la BHE, une néo-vascularisation et la surexpression du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et de son récepteur VEGFR-2.

Pour comprendre cette angiogenèse, nous avons modélisé l'épilepsie *in vivo* et *in vitro* chez le rat. *In vivo*, la néo-vascularisation, la surexpression de VEGF/VEGFR-2 et la rupture de BHE sont présentes dans un modèle avec lésions et gliose, mais transitoires dans un modèle non lésionnel.

In vitro, nous avons observé que des crises déclenchées sur des cultures organotypiques d'hippocampe (COHs) induisent une angiogenèse et une dégradation de BHE qui ne persiste qu'en présence de lésions.

Nous avons étudié le rôle du VEGF *in vitro,* en le neutralisant ou en inhibant des voies de signalisation de VEGFR-2 dans les COHs, confirmant l'importance de PKC et src dans l'angiogenèse et la dégradation de BHE. De plus, nous avons montré un déséquilibre des angiopoiétines en faveur d'Ang2 qui potentialise les effets du VEGF.

Chez l'homme et l'animal, la rupture de BHE persiste dans les foyers chroniques entretenant l'induction des crises. En ciblant les facteurs angiogéniques pour réparer la BHE, nous espérons réduire l'épileptogenèse et donc proposer de nouvelles stratégies pour les épilepsies réfractaires.

MOTS CLES

Epilepsie du Lobe Temporal; Pharmaco-résistance ; Barrière hémato-encéphalique; Vascularisation ; Angiogenèse ; VEGF / VEGFR-2 ; Angiopoiétines / Tie2 ; Hippocampe ; Status epilepticus ; Embrasement ; Cultures organotypiques

Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR 5203, INSERM U661, UM1-UM2
141 avenue de la Cardonille
34094 Montpellier Cedex 5, France

TITLE

Angiogenesis: a new therapeutic target for intractable epilepsies.

ABSTRACT

In Temporal Lobe Epilepsy, hyper excitability is commonly attributed to neuronal loss, gliosis, and synaptic plasticity in the hippocampus. A vascular remodeling has never been investigated in epileptic tissue, although recent data indicate that blood-brain barrier (BBB) permeability is epileptogenic.

In the hippocampus of patients with intractable TLE, we observed vascular changes like BBB leakage, increased vascular density and over expression of *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) and its receptor VEGFR-2.

To understand the mechanisms of this angiogenesis, we used *in vivo* and *in vitro* rat models of epilepsy. *In vivo,* we found neo-vascularization, over expression of VEGF/VEGFR-2 and BBB disruption in a model with neuronal loss and gliosis, whereas in a model without lesion these vascular changes were only transient. *In vitro,* we showed that seizures, generated in organotypic hippocampal cultures (OHCs), induce angiogenesis and BBB degradation which persist only in presence of lesions.

We investigated *in vitro* the role of VEGF by neutralizing VEGF or inhibiting different VEGFR-2 signaling pathways in OHCs and confirmed the importance of PKC and src pathways in angiogenesis and BBB degradation. More, we observed a deregulation of angiopoietin ratio in favor of Ang2, which increases VEGF effects.

In humans and animals, angiogenesis and BBB disruption persist in the chronic focus, whereas BBB leakage is known to participate in seizure induction. Therefore, by targeting angiogenic factors, we aim at repairing the BBB and thus reducing epileptogenicity. This study could lead to the development of new therapies for intractable epilepsies.

KEY-WORDS

Temporal Lobe Epilepsy ; Drug-refractoriness ; Blood-Brain Barrier; Vascularization; Angiogenesis; VEGF / VEGFR-2; Angiopoietins / Tie2 ; Hippocampus ; Status epilepticus ; Kindling ; Organotypic cultures

Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR 5203, INSERM U661, UM1-UM2
141 avenue de la Cardonille
34094 Montpellier Cedex 5, France

Figure 1 : Intérêt de la recherche sur le rôle de la BHE dans l'épilepsie ……**p.15**
Figure 2 : Les différentes formes d'épilepsie……..**p.19**
Figure 3 : Anatomie de l'hippocampe……**p.23**
Figure 4 : Le circuit tri-synaptique excitateur de l'hippocampe……...**p.24**
Figure 5 : Efférences de l'hippocampe……...**p.25**
Figure 6 : Exemple d'un tracé EEG d'une crise temporale……**p.27**
Figure 7 : Variations du débit sanguin ……...**p.28**
Figure 8 : Décours temporel du développement d'une ELT……..**p.30**
Figure 9 : Comparaison entre un hippocampe sain et un hippocampe épileptique……**p.31**
avec sclérose et dispersion du gyrus denté
Figure 10 : Différentes étiologies de l'épilepsie du lobe temporal ……..**p.33**
Figure 11 : Mécanismes de l'épileptogenèse...……**p.34**
Figure 12 : Schéma des modèles lésionnels……....**p.37**
Figure 13 : Tranches organotypiques d'hippocampe marquées au fluorojade ……**p.42**
Figure 14: Boucle neurogenèse et épileptogenèse ……...……...**p.45**
Figure 15 : Canalopathies acquises ……....**p.48**
Figure 16 : Structure des transporteurs multidrogues ……....**p.50**
Figure 17 : Structure de Pgp ……**p.50**
Figure 18 : Promoteur MDR1 de la souris. Principaux sites de régulation de la transcription……...**p.51**
Figure 19 : Structure des MRPs ……**p.52**
Figure 20*:* Analogie entre la botanique et l'arbre vasculaire par Leonardo Da Vinci……..**p.55**
Figure 21: Vasculogenèse et Angiogenèse……..**p.57**
Figure 22: Etapes de l'angiogenèse……**p.58**
Figure 23: Promoteur du VEGF……....**p.59**
Figure 24: Régulation de l'activité de HIF-1……..**p.61**
Figure 25 : Gène humain du VEGF-A……..**p.64**
Figure 26: Isoformes du VEGF……**p.66**
Figure 27: Récepteur-tyrosine kinase du VEGF …….....**p.68**
Figure 28: Structure NRP1 et co-récepteur VEGFR-2……..**p.69**
Figure 29*:* Cellules confluentes, survie et VE-cadherine……**p.70**
Figure 30: Liaison de VEGF, activation et dimérisation de VEGFR-2……..**p.72**
Figure 31: Voies de signalisation de VEGFR-2 en réponse à l'activation par VEGF-A…….**p.75**
Figure 32: Famille des angiopoiétines et leurs isoformes……...**p.78**

Figure 33*:* Récepteurs Tie et ligands associés…….**p.79**
Figure 34: Voies de signalisation suite à l'activation de Tie2 par Ang1……..….**p.81**
Figure 35: Voies de régulation de Tie2……..…….**p.82**
Figure 36 : Schéma récapitulatif du rôle des chimiokines dans l'angiogenèse…….……..**p.84**
Figure 37: Angiogenèse physiologique au cours du développement……**p.87**
Figure 38: Angiogenèse tumorale par sprouting …….**p.89**
Figure 39: Angiogenèse tumorale par cooptation……**p.90**
Figure 40: Décours temporel des évènements et de l'activation des facteurs angiogénique suite à une ischémie cérébrale……..**p.91**
Figure 41: Thérapies anti-angiogéniques développées en cancérologie……**p.93**
Figure 42 : Chronologie de la découverte de la BHE……..**p.96**
Figure 43 : Constituants de la barrière hémato-encéphalique……...……**p.97**
Figure 44 : Astrocytes et modulation du débit sanguin……...….…**p.102**
Figure 45 : Vue schématique des différents transporteurs et récepteurs de la BHE…….....**p.103**
Figure 46 : Transport par un transporteur……**p.104**
Figure 47 : Transport des protéines ……**p.107**
Figure 48 : Transport ionique ……..**p.107**
Figure 49 : Complexes protéiques cadhérine/caténines au niveau des jonctions adhérentes **p.111**
Figure 50 : Structure du complexe nectine/afadine ……..**p.112**
Figure 51 : Le complexe des jonctions serrées…….…..**p.113**
Figure 52 : Stucture de l'occludine……...…..**p.114**
Figure 53 : Structure des claudines……....….**p.115**
Figure 54 : Structure du promoteur de la claudine-5……..……**p.116**
Figure 55 : Structure des JAMs……...……**p.117**
Figure 56 : Structure de ZO-1…….……..**p.118**
Figure 57 : Structure de ZO-2 et ZO-3…….……**p.119**
Figure 58 : Structure des MAGIs…….……**p.119**
Figure 59 : Structure des protéines MUPP-1, PAR-3 et PAR-6……...……..**p.120**
Figure 60 : Interaction au sein des TJs ……**p.122**
Figure 61 : Interactions entre les protéines membranaires et les protéines adaptatrices…….**p.123**
Figure 62 : Interactions entre protéines adaptatrices et cytosquelette……**p.125**
Figure 63 : Schéma récapitulatif de la régulation de la perméabilité par les RhoGTPases…..**p.129**
Figure 64 : Mécanismes de l'augmentation cytosolique de calcium …….…..**p.130**

Figure 65 : Augmentation du flux paracellulaire suite à la phosphorylation des l'occludine et ZO-1 en réponse au VEGF…….…**p.133**
Figure 66: Rôle du VEGF dans la perméabilité des jonctions adhérentes……**p.135**
Figure 67 : Structure des métalloprotéinases….……...**p.136**
Figure 68 : Schéma de la rupture de la BHE et de la perfusion sanguine et œdème ……..…**p.139**
Figure 69 : Préparation des COHs selon la méthode de Stoppini ……..…..**p.146**
Figure 70 : Exemple d'une grille de comptage pour les cultures organotypiques……..…**p.149**
Figure 71 : Exemple de courbe obtenue après qRT-PCR…….……**p.151**
Figure 72 : Vascularisation chez un patient témoin et deux patients épileptiques ……**p.161**
Figure 73 : Vascularisation des aires CA1 et du gyrus denté chez un animal contrôle et aux différentes phases de l'épileptogenèse……**p.162**
Figure 74 : Expression de VEGF dans l'ELT……..**p.163**
Figure 75 : Expression de VEGF au cours de l'épileptogenèse chez le rat ……...…**p.163**
Figure 76 : Expression de VEGFR-2 ……...**p.164**
Figure 77 : Le VEGF, les récepteurs Flk-1 et Tie2 sont aussi fortement exprimés dans le pôle temporal……...…….**p.165**
Figure 78 : Intégrité de la BHE: expression de ZO-1 ……..……**p.166**
Figure 79 : Perméabilité de la BHE : Fuites d'IgGs sériques ……..….……**p.167**
Figure 80 : Schéma du remodelage vasculaire induit par une crise (1)…….…….…….**p.168**
Figure 81 : Modèles in vitro de crises avec ou sans lésions secondaires ……..…….**p.170**
Figure 82 : Protocole expérimental de l'étude de la densité vasculaire ……**p.171**
Figure 83 : Vascularisation des COHs. ……...……**p.172**
Figure 84 : Protocole expérimental pour l'étude de l'intégrité de la BHE…....…….**p.173**
Figure 85 : Intégrité de la BHE après les crises……**p.173**
Figure 86 : Expression de l'occludine et de la claudine-5…….**p.174**
Figure 87 : Cinétique de l'expression de VEGF…….…..**p.176**
Figure 88 : Cinétique de l'expression de VEGFR-2…….……**p.177**
Figure 89 : Protocoles expérimentaux : applications de rVEGF ou de l'anticorps neutralisant le VEGF……..…**p.178**
Figure 90 : Angiogenèse et intégrité de la BHE après application de rVEGF ……..…**p.179**
Figure 91 : Inhibition de la neo-vascularisation par la neutralisation du VEGF……**p.180**
Figure 92 : Inhibition de la dégradation de la BHE par la neutralisation du VEGF…...…...**p.181**
Figure 93 : Protocole expérimental de l'inhibition des voies de signalisation……...…**p.182**
Figure 94 : Effet de l'inhibition de src…….….…....**p.183**

Figure 95 : Effet de l'inhibition de PI3K…….**p.184**
Figure 96 : Effet de l'inhibition de PKC……..**p.185**
Figure 97 : Schéma du remodelage vasculaire après une crise (2)……**p.187**
Figure 98 : Expression de l'IL-1β dans l'aire CA3 de l'hippocampe ……**p.189**
Figure 99 : Evaluation de la perméabilité de la BHE …….. **p.190**
Figure 100 : Evaluation de la densité vasculaire et de l'expression de VEGF……...……**p.191**
Figure 101 : Expression de l'IL1-β dans l'aire CA3 de l'hippocampe……...…….**p.192**
Figure 102 : Marquage des IgGs……..……**p.193**
Figure 103 : Evaluation de la densité vasculaire et de l'expression de VEGF……...……**p.194**
Figure 104 : Vascularisation des différentes structures chez les rats kindling et contrôle.…**p.197**
Figure 105 : Expression de VEGF dans l'hippocampe au cours du kindling chimique...….**p.198**
Figure 106 : Expression de VEGFR-2 dans l'hippocampe au cours du kindling chimique..**p.199**
Figure 107 : Intégrité de la BHE de l'hippocampe au cours du kindling chimique……..…**p.201**
Figure 108 : Protocole expérimental pour l'étude de l'expression d'Ang1 et 2……...….**p.204**
Figure 109 : Expression d'Ang1 et Ang2 dans le modèle kainate…….....….**p.205**
Figure 110 : Expression d'Ang1 et Ang2 dans le modèle bicuculline…….....……**p.206**
Figure 111 : Protocole expérimental de l'application de rAng1……..….**p.207**
Figure 112 : Effet de la rAng1 sur l'expression de ZO-1 à la BHE après des crises ……...**p.208**
Figure 113 : Schéma du remodelage vasculaire après une crise (3)…….……**p.209**

Table 1 : Classification internationale des crises épileptiques et des épilepsies……...……**p.20**
Table 2 : Modèles d'étude de l'épileptogénèse……...**p.230**
Table 3 : Comparaison des stades entre le kindling chimique et électrique…….....**p.36**
Table 4 : Isoformes du VEGF …….....**p.65**
Table 5 : Etudes des facteurs angiogéniques et leurs récepteurs ..…….……**p.232**
Table 6 : Souris transgéniques avec mutations des facteurs angiogéniques…...…..……**p.235**
Table 7: Transporteur des acides aminés localisés sur les cellules endothéliales de la BHE.**p.105**
Table 8 : Les principales protéines des jonctions cellulaires ……...……**p.237**

RESUME EN FRANÇAIS .p.1
RESUME EN ANGLAIS .p.2
TABLES DES MATIERES .p.3
SOMMAIRES DES FIGURES .p.7
ABBREVIATIONS .p.11
PROLOGUE .p.13
INTRODUCTION CHAPITRE I : EPILEPSIE .p.17
A. L'épilepsie ou les épilepsies .p.18
B. L'épilepsie du lobe temporal .p.21
B.1 L'hippocampe .p.21
B.1.1 Historique .p.21
B.1.2 Anatomie de l'hippocampe .p.22
B.1.3 Fonctions de l'hippocampe .p.25
B.2 Symptomatologie de l'épilepsie du lobe temporal .p.26
B.2.1 Symptômes cliniques .p.26
B.2.2 Investigations de l'épilepsie .p.26
B.2.3 L'épilepsie de lobe temporal, la forme la plus fréquente .p.28
B.3 Etiologies des épilepsies du lobe temporal .p.30
B.3.1 Sclérose de l'hippocampe .p.30
B.3.2 Autres étiologies .p.32
B.4 Epileptogénèse .p.34
B.4.1 Définitions .p.34
B.4.2 Modèles animaux d'ELT : Compréhension de l'épileptogénèse .p.35
B.4.2.1 Modèles induits *in vivo* .p.35
B.4.2.2 Modèles génétiques d'épilepsie .p.39
B.4.2.3 Modèles de rats pharmacorésistants .p.40
B.4.2.4 Modèles *in vitro* .p.40
B.4.3 Mécanismes de l'épileptogenèse connus .p.42
B.4.3.1 Facteurs génétiques .p.42
B.4.3.2 Facteurs acquis : Altérations cellulaires et moléculaires .p.43
C. La pharmacorésistance .p.48
C.1 Définition .p.48
C.2 Les transporteurs multi-drogues .p.49
C.2.1 Multi-drug resistance 1 ou MDR-1 .p.50
C.2.1.1 Structure .p.50
C.2.1.2 Régulation du gène mdr .p.51
C.2.1.3 Localisation, mécanismes d'action et pathologie .p.51
C.2.2 Autres transporteurs impliqués dans la pharmacorésistance .p.52
C.2.2.1 « Multi-drug resistance protein » ou MRP .p.52
C.2.2.2 « Breast Cancer Related Protein » ou BCRP .p.52
C.3 Transporteurs et pharmacorésistance dans l'épilepsie .p.53
INTRODUCTION CHAPITRE II : ANGIOGENESE .p.54
A. Formation des vaisseaux sanguins .p.56
A.1 Définitions .p.56
A.2 Etapes de l'angiogenèse .p.57
B. Les facteurs angiogéniques .p.58
B.1 Le système VEGF/VEGF-récepteur .p.58
B.1.1 Régulation transcriptionnelle du VEGF .p.59
B.1.1.1 Facteur induit par l'hypoxie : HIF .p.59
B.1.1.2 Facteur sp1 .p.61
B.1.1.3 Facteur de transcription AP-1 .p.62
B.1.1.4 Autres facteurs de transcription .p.63
B.1.2 La protéine VEGF .p.63
B.1.2.1 Famille du VEGF .p.63

B.1.2.2 Isoformes du VEGF-A .p.64
B.1.3 Récepteurs du VEGF : structure, activation et rôle .p.66
B.1.3.1 Structure des récepteurs .p.66
B.1.3.2 Co-récepteurs .p.68
B.1.3.3 Activation des récepteurs et signalisation .p.71
B.2 Le système Angiopoiétines/Tie .p.76
B.2.1 La famille Angiopoiétines .p.76
B.2.2 Complexe Ang/Tie .p.78
B.2.2.1 Récepteurs des Angiopoiétines .p.78
B.2.2.2 Activation du système Ang1/Tie2 .p.79
B.2.2.3 Activation de Tie2 par Ang2 .p.81
B.2.2.4 Régulation de la signalisation de Tie2 .p.81
B.2.2.5 Autres systèmes de régulation .p.83
B.3 Autres facteurs angiogéniques .p 83
B.3.1 Les cytokines angiogéniques .p.83
B.3.1.1 Les chimiokines .p.83
B.3.1.2 Les Transforming Growth Factor .p.84
B.3.2 Facteurs angiogéniques solubles et membranaires .p.85
C. Régulation de l'angiogenèse physiologique et pathologique .p.86
C.1 Angiogenèse physiologique .p.86
C.1.1 Au cours du développement .p.86
C.1.2 A l'âge adulte .p.88
C.2 Angiogenèse pathologique .p.88
C.2.1 Angiogenèse tumorale .p.88
C.2.2 Ischémie cérébrale .p.90
C.2.3 Angiogenèse et rétinopathies .p.91
C.2.4 La thérapie anti-angiogénique .p.92
C.2.5 La thérapie pro-angiogénique .p.93
INTRODUCTION CHAPITRE III : BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE .p.95
A. Barrière hémato-encéphalique ou « unité neurovasculaire » .p.97
A.1 Structure de la BHE .p.97
A.2 Les cellules endothéliales .p.98
A.3 Les péricytes .p.99
A.4 Les neurones .p.100
A.5 La microglie .p.100
A.6 Les astrocytes .p.100
A.6.1 Homéostasie ion-eau .p.101
A.6.2 Maintien des propriétés de la barrière .p.101
A.6.3 Contrôle du flux sanguin .p.102
B. Une « barrière métabolique » : transport sélectif .p.102
B.1 Le transport via un transporteur .p.103
B.1.1 Transport du glucose .p.104
B.1.2 Transport des acides aminés .p.105
B.2 Transport de peptides, de protéines et calveolin .p.106
B.3 Transport ionique .p.107
C. Barrière « physique » : Jonctions adhérentes et serrées .p.108
C.1 Jonctions adhérentes .p.108
C.1.1 Le complexe cadhérines/caténines .p.108
C.1.1.1 Cadhérines .p.108
C.1.1.2 Caténines .p.109
C.1.2 Le complexe Nectine/Afadine .p.111
C.2 Jonctions serrées .p.112
C.2.1 Protéines membranaires .p.113

C.2.1.1 Occludine .p.113
C.2.1.2 Claudines .p.115
C.2.1.3 Junctional adhesion molecules (JAMs) .p.116
C.2.2 Complexes protéiques associés .p.117
C.2.2.1 Les protéines de la famille MAGUK .p.117
C.2.2.2 Autres protéines intracellulaires .p.120
D. Interactions des protéines .p.121
D.1 Interactions de l'occludine .p.122
D.2 Interactions des claudines .p.124
D.3 Interactions de zonula occludens .p.124
D.4 Assemblage des jonctions serrées .p.126
E. Perméabilité de la BHE et pathologies .p.127
E.1 Régulation de la perméabilité .p.127
E.1.1 Altération de l'actine .p.127
E.1.1.1 Petites GTPases .p.127
E.1.1.2 La voie des seconds messagers .p.129
E.1.2 Modifications post-traductionnelles des protéines .p.131
E.1.2.1 Phosphorylations des Tjs .p.131
E.1.2.2 Phosphorylations des AJs .p.134
E.1.3 Dégradation des protéines de jonctions .p.135
E.1.3.1 Métalloprotéinases .p.136
E.1.3.2 Tissue & urokinase plasminogen activators (tPA,/uPA) .p.138
E.2 Conséquences de la perméabilité .p.138
E.2.1 Hypoperfusion, œdème et inflammation dans l'ischémie .p.139
E.2.1.1 Hypoperfusion .p.139
E.2.1.2 Œdèmes .p.140
E.2.1.3 L'inflammation .p.140
E.2.2 Perméabilité de la BHE et épilepsie .p.140
OBJECTIFS .p.142
MATERIELS & METHODES .p.144
A. Quels modèles d'épilepsie ont été utilisés ? .p.145
A.1 Modèle *in vivo* .p.145
A.1.1 Modèle chronique : lithium-pilocarpine .p.145
A.1.2 Modèle non chronique : Kindling PTZ .p.145
A.2 Modèle *in vitro* .p.146
A.2.1 Culture organotypique d'hippocampe .p.146
A.2.2 Induction des crises .p.147
B. Comment évaluer la densité vasculaire ? .p.149
C. Comment l'expression des facteurs angiogéniques a-t-elle été évaluée ? .p.150
C.1 Expression des transcrits .p.150
C.2 Expression des protéines .p.152
C.3 Sécrétion de VEGF .p.153
C.4 Localisation cellulaire des protéines .p.153
C.4.1 Localisation cellulaire de VEGF .p.154
C.4.2 Localisation cellulaire de VEGFR-2 .p.155
C.4.3 Localisation cellulaire de Tie2 .p.156
C.4.4 Localisation des IgGs .p.157
C.4.5 Localisation de ZO-1 .p.158
RESULTATS CHAPITRE 1 .p.159
A. Remodelage vasculaire dans l'ELT .p.160
B. Présence de facteurs angiogéniques dans les ELTs .p.162
C. Rupture de la BHE dans les foyers épileptiques .p.165
C.1 Intégrité ou dégradation de la BHE .p.166

C.2 Perméabilité de la BHE .p.166
RESULTATS CHAPITRE II .p.169
A. Les crises sont suffisantes pour induire l'angiogenèse .p.171
B. Les crises induisent une dégradation des jonctions serrées de la BHE .p.172
B.1 Expression de la protéine d'échafaudage « zonula occludens-1 » .p.173
B.2 Evaluation des protéines transmembranaires des jonctions serrées .p.174
C. Les crises induisent l'expression de VEGF et VEGFR-2 .p.175
C.1 Expression, sécrétion et localisation cellulaire de VEGF .p.175
C.2 Expression et localisation cellulaire de VEGFR-2 .p.176
D. VEGF est-il nécessaire et suffisant pour induire une angiogenèse et une rupture de la BHE après une crise épileptique ? .p.178
D.1 Application de VEGF recombinant (rVEGF) .p.179
D.2 Neutralisation de l'activité VEGF .p.179
E. Activation du couple VEGF/VEGFR-2 : implication des voies src, PI3K PKC .p.181
E.1 Implication de la voie src .p.182
E.2 Implication de la voie PI3K .p.183
E.3 Implication de la voie PKC .p.185
RESULTATS CHAPITRE 3 .p.188
A. L'épilepsie chronique et les changements vasculaires sont dépendants de l'âge : processus de protection ? .p.189
A.1 Après *status epilepticus* chez les rats PN9 .p.189
A.1.1 Inflammation .p.189
A.1.2 Perméabilité de la BHE .p.190
A.1.3 Angiogenèse et expression de la BHE .p.191
A.2 Après *status epilepticus* chez les rats PN21 .p.192
A.2.1 Inflammation .p.192
A.2.2 Perméabilité de la BHE .p.192
A.2.3 Angiogenèse et expression de VEGF .p.193
B. Angiogenèse et rupture de la BHE dans un modèle d'hyperexcitabilité (sans épilepsie chronique) .p.195
B.1 Etude de la densité vasculaire .p.196
B.2 Expression de VEGF .p.198
B.3 Expression de VEGFR-2 .p.199
B.4 Intégrité de la BHE dans l'hippocampe .p.200
B.5 Intégrité de la BHE et expression de VEGF dans les autres structures .p.201
C. Réparation de la BHE : quelles cibles thérapeutiques ? .p.203
C.1 Equilibre Ang1/Ang2 .p.204
C.1.1 Expression de Ang1 et Ang2 dans le modèle kainate .p.204
C.1.2 Expression de Ang1 et Ang2 dans le modèle bicuculline .p.206
C.2 Est-ce qu'une augmentation de la concentration d'Ang1 peut réparer la BHE ? .p.207
DISCUSSION .p.210
1ère partie : Angiogenèse dans les foyers épileptiques .p.211
2ème partie : Conséquences d'une angiogenèse pathologique : Dégradation de la BHE .p.214
3ème partie : L'épileptogenèse : une conséquence de la dégradation de la BHE .p.217
4ème partie : Protection de la BHE : De nouvelles cibles thérapeutiques ? .p.220
CONCLUSION-PERSPECTIVES .p.223
ANNEXES .p.226
Articles .p.227
Tables .p.230
BIBLIOGRAPHIE .p.238

AA: Acide aminé
ABC: ATP-binding cassette
ACQP : Aquaporines
AEDs : Médicaments anti-épileptiques
AJs : Adherens junction ou jonctions adhérentes
AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
Ang: Angiopoiétines
AP: Activator-complex protein
AVC: Accidents Vasculaire Cérébraux
BCRP: Breast Cancer Resistance Protein
BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor
bFGF: basic Fibroblaste Growth Factor
BHE: Barrière hémato-encéphalique
BMPs : bone morphogenic proteins
CA: Corne d'Ammon
COH: Culture Organotypique d'Hippocampe
CSF: Fluide cérébrospinal
DAB: 3'3'diaminobenzidine
DGCs: Cellules granulaires du gyrus denté
DO: Densité optique
EC: Cellules Endothéliales
ECM: Extra-Cellular Matrix
EEG: Electroencéphalogramme
EGF: epidermal growth factor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELT: Epilepsie du Lobe Temporal
eNOS: endothelial Nitric Oxide Synthase
Eph: Récepteurs des ephrines
EPO: Erythropoïétine
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases
FGF: basic Fibroblast Growth Factor
FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor
FITC: Fluorescein Iso Thio Cyanate
FGF: Fibroblast Growth Factor
FIH-1: Factor inhibiting HIF-1
Flk-1: fetal liver kinase-1
Flt-1: fms-like-tyrosine kinase
GD: Gyrus Denté
GLUT: Transporteur du glucose
HGF: Hepatocyte Growth Factor
HIF: Hypoxia Inducible Factor
HRP: Peroxydase de raifort
IB4: Isolectine B4
ICAM-1: Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IFN: Interferon
IGF-1: Insulin-like Growth Factor
IgG: Immunoglobuline G
IL: Interleukine
IP3 : Inositol 1,4,5 Tri-Phosphate
i.p : Intraperitonéal

IRM : Imagerie par resonance magnétique
ILAE: International League Against Epilepsy
JAM: Junctional Adhesion Molecules
KDR: Kinase domain region
LDH: Lactate Deshydrogenase
MAGI: Membrane-associated guanylate kinase inverted
MAGUK: Membrane-Associated Guanylate Kinase
MDR: Multi-drug resistence
MMP: Matrix Metalloproteases
MRP: Multidrug resistance-associated protein
NFkB: Nuclear Factor-Kappa B
NMDA: N-méthyl-D-aspartate
NO: Monoxyde d'Azote
NRP: Neuropilines
NT: Neurotransmetteurs
PBS: Phosphate Buffer Saline
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PECAM : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PET: Position Emission Tomography
PFA: Paraformaldéhyde
PI: Iodure de Propidium
PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase
PIGF: Placenta growth factor
PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC: Protein Kinase C
PLC-γ : Phospholipase C-γ
Pgp : P-glycoprotéine
PN: Post-Natal
PS: Post Seizures
PTZ: Pentylenetetrazol
pVHL: Von Lindau Protein
qRT-PCR : Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
SE: Status Epilepticus
SGZ: zone sous-granulaire
SH: Sclérose hippocampique
SNC: Système nerveux central
SPECT: Single Photon Emission Tomography
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription
TEER: TransEndothelial Electric Resistance
TA: Température Ambiante
TEM: Tomographie d'Emission Monophotonique
TEP: Tomographie d'Emission de Positions
TGF: Transforming Growth Factor
Tie: Tyrosin kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like Domain
TJs: Tight junctions ou jonctions serrées
TNF: Tumor Necrosis Factor
tPA: Tissue Plasminogen Activator
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
ZO: Zonula Occludens

PROLOGUE

L'épilepsie, considérée comme un problème de santé publique majeur, est aujourd'hui la deuxième maladie neurologique après les migraines. Un à 2% de la population est ou sera épileptique à un moment de la vie, avec deux pics de fréquence (avant 10 et après 60 ans), mais seulement la moitié développera une épilepsie chronique ou active.

Il n'existe pas **une** épilepsie mais **des** épilepsies, tant leurs manifestations, leurs degrés de gravité et leurs réponses aux médicaments sont divers. L'épilepsie se caractérise par la récurrence de crises épileptiques. On définit la crise comme l'apparition brutale et excessive de décharges de potentiels électriques au sein d'une population de neurones du cerveau, qui peut atteindre soit l'ensemble des deux hémisphères (crises généralisées) soit une région limitée (crises partielles ou focales) (Engel, J., Jr., *et al. - 2006*).

Parmi les formes partielles, une forme complexe d'épilepsie affecte 0,3% de la population : **l'épilepsie du lobe temporal** (ELT), dont les crises naissent dans des structures du lobe temporal. L'ELT est très fréquente. Ses étiologies sont encore mal très connues et aucun substrat commun n'a été décrit jusqu'à présent, bien que les paramètres cliniques tels que la sémiologie des crises, les variations hémodynamiques et métaboliques et la sensibilité aux médicaments soient relativement identiques (Engel, J., Jr. - *2001*). Les médicaments anti-épileptiques (AEDs) restent majoritairement ciblés sur le système GABAergique, les canaux calciques et sodiques (Meldrum, B. S., *et al. - 2007*). Il est intéressant de noter que les médicaments les plus performants ont des cibles diverses, peu spécifiques, voire même inconnues.

Quelle que soit l'étiologie, la pharmacorésistance s'installe rapidement ou progressivement chez un tiers des patients. Le recours à la chirurgie, lorsque le foyer est bien identifié et accessible, reste la seule alternative thérapeutique avec le risque d'effets secondaires, notamment cognitifs, et un impact économique important. Dans le bilan pré-chirurgical, la localisation précise du foyer épileptique se fait par l'imagerie fonctionnelle du débit sanguin et du métabolisme du glucose pendant et entre les crises et par des enregistrements intracérébraux.

On a longtemps pensé que la cause de l'épilepsie relevait exclusivement d'un dysfonctionnement neuronal. Il est vrai que la crise elle-même est une manifestation essentiellement neuronale, mais la modification de l'environnement des neurones peut altérer leur activité et leur survie. C'est

pourquoi des hypothèses gliales, inflammatoires et immunes ont été proposées (Chneiweiss, H. - *2005,* Jankowsky, J. L.*, et al. - 2001,* Turrin, N. P.*, et al. - 2004*).

Bien qu'on retrouve dans les foyers des anomalies hémodynamiques évidentes, comme l'œdème vasogénique ou l'hypoperfusion intercritique (Oommen, K. J.*, et al. - 2004*), la voie vasculaire n'a pas été très explorée jusqu'à présent.

Dans les années 70, plusieurs études portant sur la barrière hémato-encéphalique (BHE) s'étaient focalisées sur le rôle des transporteurs présents sur cette barrière comme les transporteurs du glucose (GLUT-1) ou les transporteurs « multi-drogues résistants » (MDR) (Figure 1). Ce n'est que dans les années 2000 que la contribution de la perméabilité de BHE à l'épileptogenèse a été émise et acceptée (Oby, E. and Janigro, D. - *2006*).

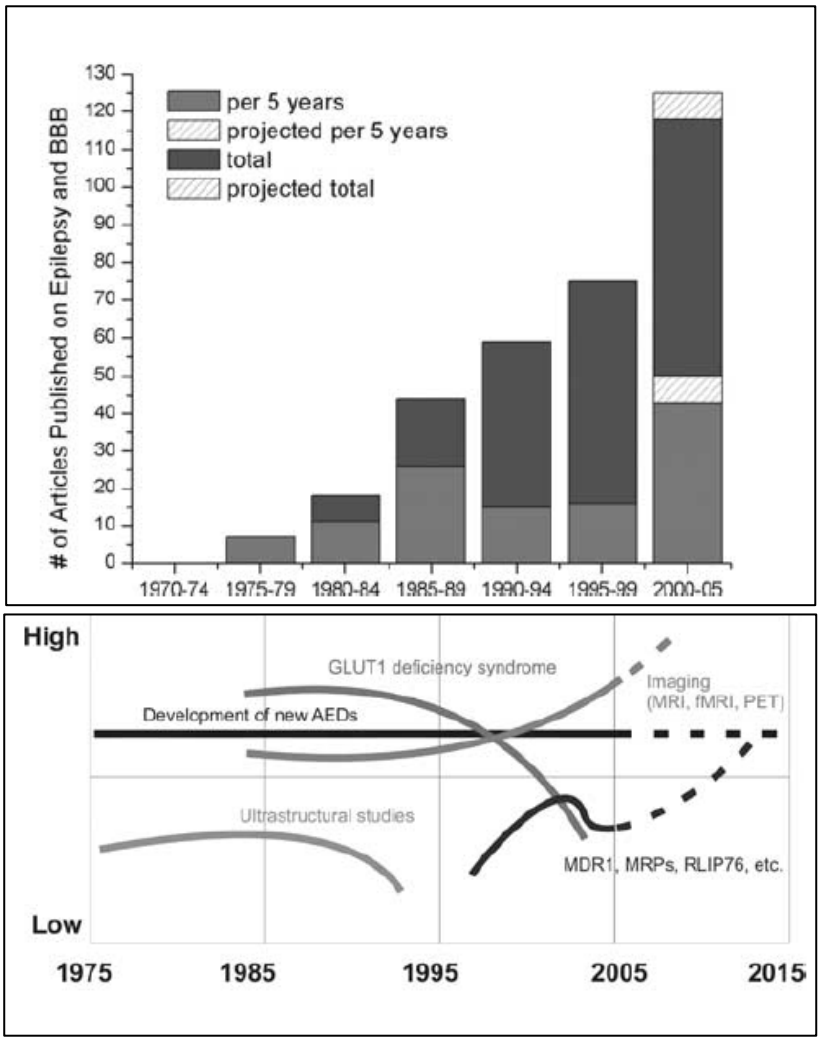


Figure 1 : Intérêt de la recherche sur le rôle de la BHE dans l'épilepsie.

A. Nombre de publications portant sur l'étude de la BHE dans l'épilepsie

B. Les principales études faites pendant cette période

(Oby, E., et al. - 2006)

Parmi ces divers articles, aucune étude n'a montré clairement la présence d'un remaniement vasculaire dans les foyers épileptiques, ni recherché quels facteurs étaient responsables de la perméabilité vasculaire. Dans l'ischémie cérébrale ou dans des pathologies neuro-dégénératives, des processus angiogéniques réparateurs ou délétères, ont été largement décrits (Zhang, Z. G., *et al. - 2000,* Zlokovic, B. V. - *2006*) démontrant notamment que l'angiogenèse est impliquée dans la perméabilité vasculaire.

C'est pourquoi, dans ce travail de thèse, nous avons cherché à mettre en évidence une angiogenèse dans les foyers épileptiques, à explorer ses mécanismes et à proposer des stratégies protectrices qui pourraient réduire la fréquence ou la sévérité des crises d'épilepsie.

Avant d'aborder et de commenter les résultats obtenus, illustrés par deux articles publiés et un soumis, cette thèse commencera par des rappels indispensables sur la pathologie épileptique, sur l'angiogenèse et sur la barrière hémato-encéphalique.

INTRODUCTION

CHAPITRE I

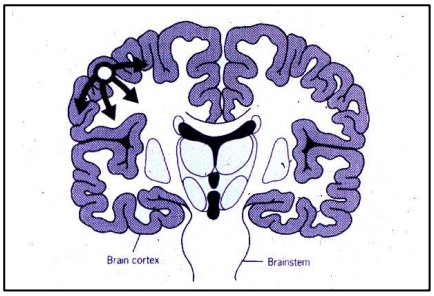
EPILEPSIE

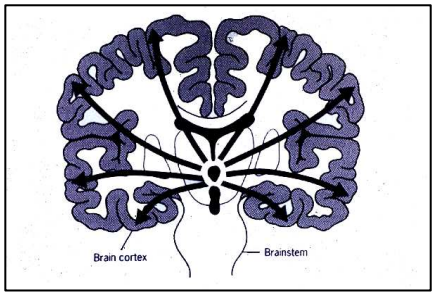
Le mot épilepsie vient du grec « επιλαμβανειν » qui signifie « attaquer ». Contrairement à son origine étymologique, la description de l'épilepsie serait apparue non pas dans l'antiquité grecque, mais dans la médecine antique indienne. Cependant, le premier vrai traité médical sur l'épilepsie, « de la maladie sacrée », est attribué à Hippocrate. Ce n'est qu'au XVIème siècle que Cardan et surtout Gabuccini rédigèrent des traités complets sur l'épilepsie. La connaissance de l'épilepsie fit un grand pas au XIXe siècle, avec John Huglings Jackson, grâce à la première classification anatomo-clinique des phénomènes épileptiques.

A. L'épilepsie ou les épilepsies

Il faut distinguer la crise épileptique de la maladie épilepsie. En effet, la **crise d'épilepsie** se définit comme l'apparition brutale et transitoire de décharges électriques au sein d'une population de neurones, provoquées par une hyperexcitabilité neuronale et/ou une hyper-synchronie. La survenue de crises récurrentes est la caractéristique fondamentale de **la maladie épileptique** dont l'aspect paroxystique et imprévisible surprend aussi bien le patient que l'entourage. Elles sont associées à des manifestations comportementales très diverses, souvent accompagnées d'une perte de conscience.
D'un point de vue épidémiologique, l'épilepsie a une prévalence de 4 à 10 pour 1000 et une incidence de 50 pour 100 000 habitants, ce qui la place dans les premières pathologies neurologiques avec les migraines et les démences. Cinquante millions de personnes, soit 1 à 2% de la population mondiale, sont considérées épileptiques à un moment de leur vie (pics de fréquence avant 10 ans et après 60 ans), mais seulement la moitié développent une épilepsie chronique ou active (Mchugh, J. C., *et al. - 2008,* Picot, M. C., *et al. - 2008*).

En 1989, la commission de l'ILAE (*International League Against Epilepsy*) a présenté une classification des épilepsies : International Classification of Epilepsy, Epileptic Syndromes and Related Disorder. Bien qu'elle soit souvent remaniée et remise à jour, cette classification est largement acceptée et universellement employée. Elle peut se faire selon la localisation des crises ou selon leurs étiologies. Certains syndromes échappent aux approches dichotomiques. On décrit les **épilepsies généralisées** où les crises affectent l'ensemble du cortex des 2 hémisphères, et les **épilepsies partielles** où les crises ne concernent qu'une région isolée, le « foyer épileptique » (Figure 2).





Epilepsie Partielle
50 à 70 %

Epilepsie Généralisée
20 à 30 %

Figure 2 *: Différentes formes d'épilepsies*

La classification des épilepsies ou syndromes épileptiques décrit :

- Les épilepsies **idiopathiques** ne présentent aucunes lésions morphologiques décelables et leurs étiologies sont inconnues. Elles sont présumées génétiques et dépendantes de l'âge. Elles représentent 20% des épilepsies.
- Les épilepsies **symptomatiques** sont associées à une ou plusieurs lésions cérébrales identifiées. Il existe plus ou moins des facteurs génétiques. Elles représentent 40% des épilepsies.
- Les épilepsies **cryptogéniques** sont présumées symptomatiques bien qu'aucune étiologie ou lésion ait été décelée. Elles représentent 40% des épilepsies. (Auguste, P.*, et al. - 2005,* Engel, J., Jr.*, et al.* -) (Table 1)

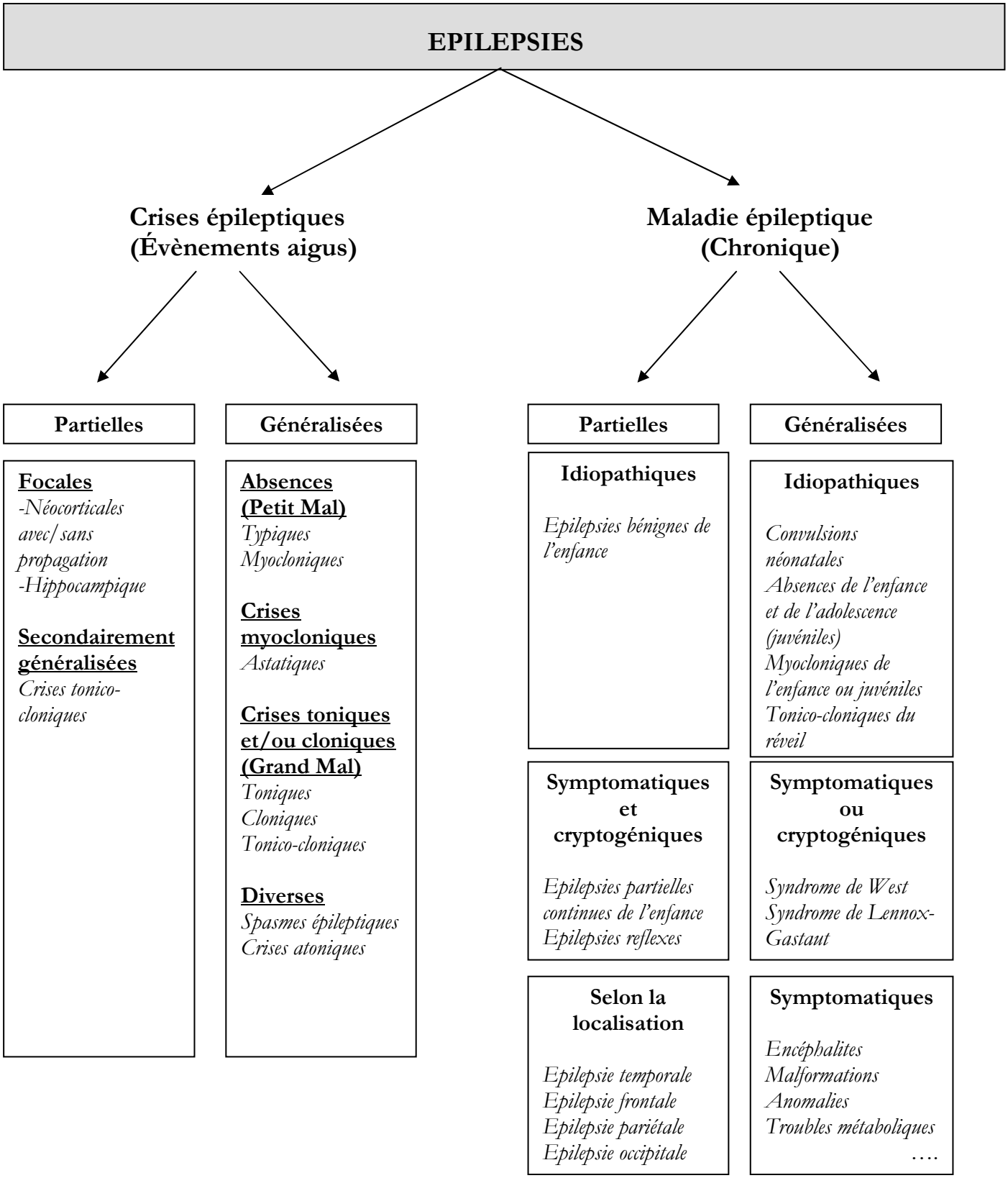


Table 1**: Classification internationale des crises épileptiques et des épilepsies. D'après l'* ***« international league against epilepsy »

Cette classification est actuellement en révision et pourrait finalement distinguer deux grands groupes : les épilepsies « focales symptomatiques » et les épilepsies « systémiques ». Dans ce dernier, on retrouve toutes les épilepsies idiopathiques, qu'elles soient partielles ou généralisées.

B. Epilepsie du lobe temporal

Le lobe temporal est une région du cerveau impliquée dans les fonctions cognitives dont l'audition, le langage et la mémoire. Dans les structures profondes de ce lobe, on trouve l'amygdale et l'hippocampe, très souvent affectées par l'épilepsie. L'hippocampe est le foyer épileptique le plus fréquent des épilepsies du lobe temporal (ELT).

B.1 L'hippocampe

B.1.1 Historique

L'hippocampe est une structure télencéphalique bilatéralisée et symétrique, faisant partie du système limbique. D'un point de vue phylogénétique, il s'agit d'une structure corticale ancienne qui s'est repliée sur elle-même et s'est enfouie sous le cortex temporal.
Traditionnellement, l'anatomie comparée identifie chez l'ensemble des vertébrés une structure homologue à l'hippocampe des mammifères, y compris chez les espèces les plus primitives telles les cyclostomes (exemple : la lamproie).
En 1587, Arentius a été le premier à utiliser le nom d'hippocampe dans son livre « De Humano Foetu », en comparant cette structure à un hippocampe (du grec hippos : cheval, kampos : monstre des mers). D'après Walther (2002), il décrivait non pas l'hippocampe tel qu'on le considère mais plutôt le gyrus denté. Ce n'est qu'en 1732 que Winslow, devant à une section coronale, nomma l'hippocampe « cornu aerieti » pour sa forme en corne de Bélier. Le nom de « cornu ammonis » ou corne d'Ammon fut donné par Garengot en 1742, Ammon étant un chef de Thèbes dans l'ancienne Egypte, souvent représenté comme un homme à tête de bélier.
Golgi introduisit en 1873 la méthode d'imprégnation argentique qui permit de mieux comprendre l'organisation du système nerveux. Et c'est en modifiant cette méthode, qu'en 1911, Ramon y Cajal et son étudiant Lorente de No, constituèrent toutes les connaissances de l'anatomie de l'hippocampe que nous utilisons toujours.
Chaque étape à généré une nomenclature anatomique : Cajal en 1911, Rose en 1926, Lorente de No en 1934. La terminologie anatomique actuelle date de 1998 (El-Falougy, H., *et al. - 2006*)
.

B.1.2 Anatomie de l'hippocampe (D'après The Hippocampus Book)

B1.2.1 Organisation des neurones (Figure 3)

L'hippocampe est une petite structure sous-corticale enroulée sur elle-même et occupant la face médiane du lobe temporal médian. Attaché à la face dorsale de l'hippocampe se trouve un ruban épais de fibres (fimbria), qui constitue le **fornix** et se termine au niveau du corps mamillaire. Connectées à l'amygdale, au septum et au thalamus, ces structures constituent les éléments principaux du système limbique, jouant un rôle fondamental dans l'apprentissage et les émotions.

Chez les mammifères, la formation hippocampique se divise en plusieurs champs: le gyrus denté, la corne d'Ammon et le subiculum.

- Le **gyrus denté (GD)** est composé par la *fascia dentata* et le hile. La fascia dentata est constituée d'une couche dense de neurones granulaires excitateurs (glutamatergiques) dont les axones non myélinisés appelés **fibres moussues**, projettent au niveau sur des neurones hippocampiques au niveau du hile et de l'aire CA3. Le hile (appelé aussi CA4) contient de nombreuses cellules, les cellules moussues excitatrices mais aussi des interneurones inhibiteurs.
- La **corne d'Ammon (CA)** est constituée de couches de cellules pyramidales, glutamatergiques donc excitatrices, divisées en plusieurs champs « ammoniens »: CA1, CA2, CA3. Le CA3 est divisé en trois secteurs : CA3a, CA3b et CA3c. Ce dernier est très proche du hile et on le considère comme le « pacemaker » de l'hippocampe. Les axones des cellules pyramidales de CA3, appelées collatérales de Schaeffer, projettent sur les dendrites de CA1. Il existe aussi de nombreux interneurones qui libèrent du GABA, du neuropeptide Y ou de la somatostine. Le CA2 est une très petite région entre le CA3 et le CA1, qui ne reçoit pas d'afférences des cellules granulaires et qui a la particularité d'être très résistante aux dommages neuronaux après une crise d'épilepsie.
- Le **subiculum** permet le lien entre le cortex entorhinal et le CA1. Il constitue la fin de l'hippocampe et reçoit des signaux des cellules pyramidales du CA1 (Lothman, E. W., *et al. - 1991*).

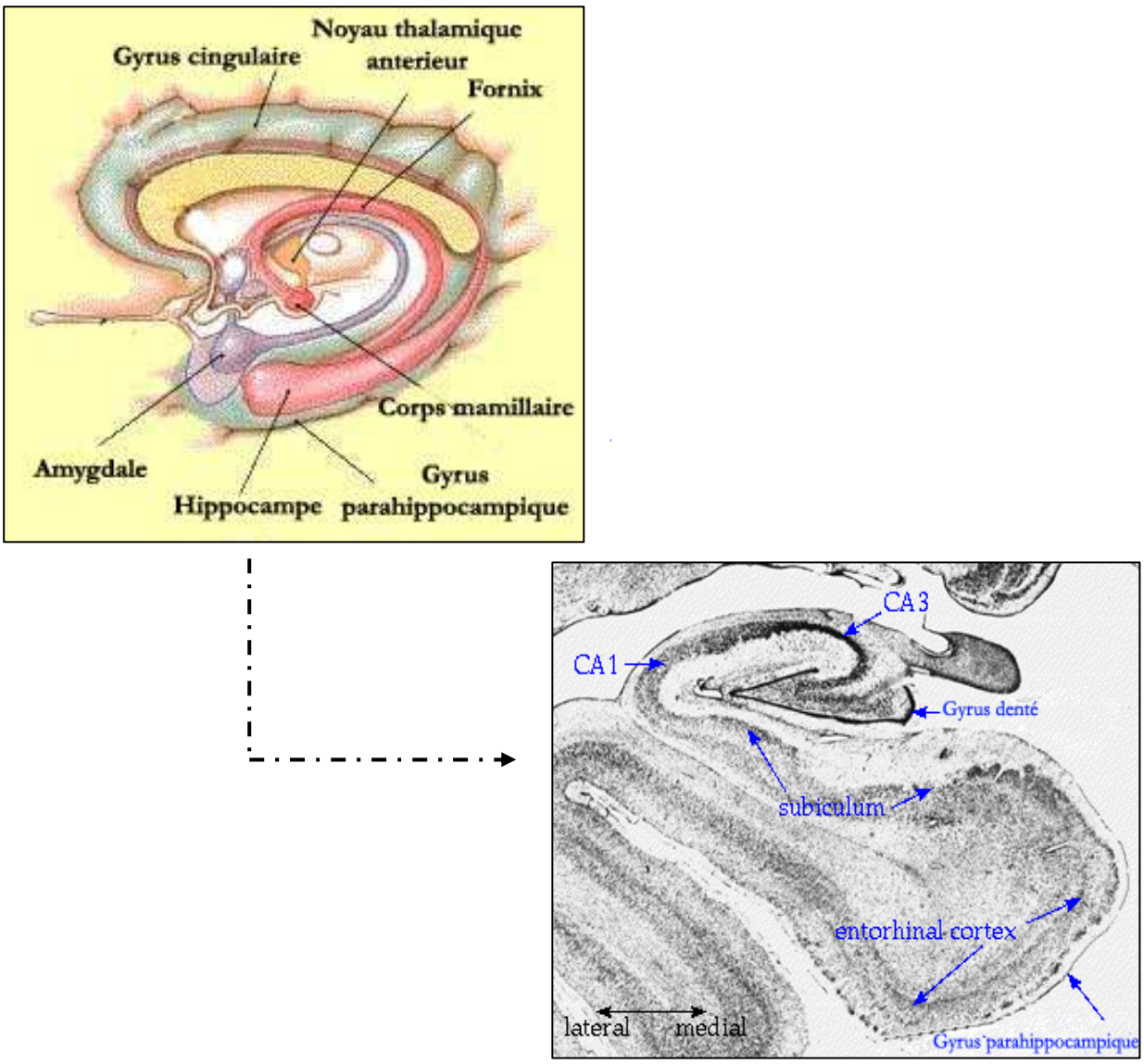


Figure 3 *: Anatomie de l'hippocampe*

B.1.2.2 Connexions de la structure hippocampe

Afférences

Un circuit fonctionnel impliquant les régions : cortex entorhinal-GD-CA3-CA1 forme une voie trisynaptique excitatrice qui est extrêmement utilisée pour les recherches sur la plasticité synaptique, la mémoire et l'épilepsie (Anderson, P., *et al. - 1971*) :

- Les neurones pyramidaux du cortex entorhinal activent par les fibres perforantes les cellules granulaires du gyrus denté (Figure 4-1)

- Les neurones granulaires activent les neurones pyramidaux de CA3 par les fibres moussues (Figure 4-2)
- Les collatérales de Schaeffer partent des cellules pyramidales de CA3 pour activer les neurones pyramidaux de CA1 (Figure 4-3)

Ensuite, les neurones de CA1 projettent hors de l'hippocampe, notamment vers le subiculum et le cortex entorhinal.

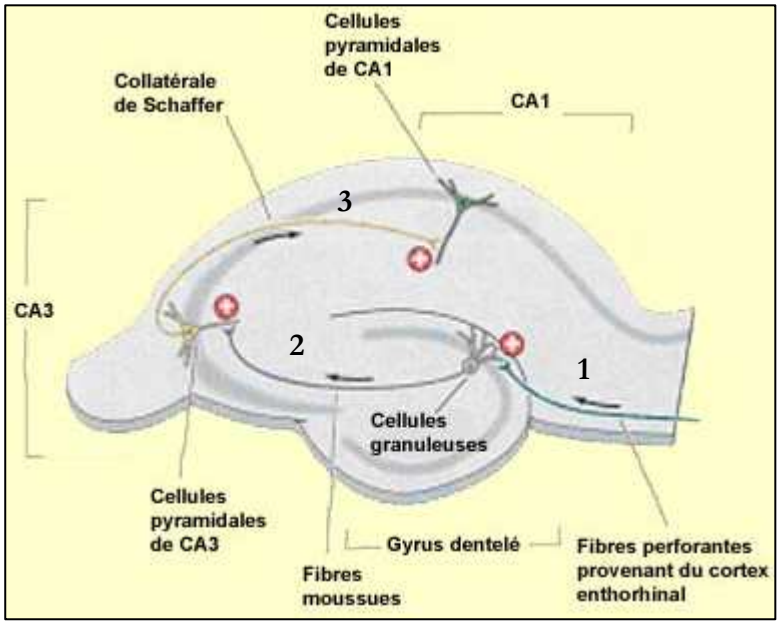


***Figure 4** : Le circuit tri-synaptique excitateur de l'hippocampe*

D'autres connexions contrôlent l'activité de ce circuit, modulant l'excitation ou l'inhibition, notamment celles des interneurones GABAergiques mais aussi les « feedbacks » des neurones GABAergiques ou peptidergiques du hile.

Efférences de l'hippocampe

La principale voie efférente de l'hippocampe est le fornix. Les neurones pyramidaux concentrent leurs axones dans ce faisceau qui projette vers d'autres structures du télencéphale et du diencéphale (noyau accumbens, formation réticulée, aire préoptique, tronc cérébral). Toutes ces connexions font partie du circuit de Papez, impliqué dans la mémoire et les émotions. Ce circuit implique l'hippocampe et trois autres structures : les corps mamillaires de l'hypothalamus, le noyau antérieur du thalamus et le cortex cingulaire. L'hippocampe est connecté également au

septum, qui lui renvoie des projections GABAergiques et cholinergiques jouant un rôle régulateur dans certains comportements tels que la reproduction ou la nutrition.

Une autre voie efférente de l'hippocampe part du subiculum et projette sur le cortex entorhinal qui, à son tour, contacte différentes aires associatives du néocortex (cortex préfrontal, cortex orbitofrontal, circonvolution parahippocampique et circonvolution du cingulum) (Figure 5).

L'hippocampe se trouve donc à un carrefour qui lui donne accès à des informations spécialisées provenant de différentes modalités sensorielles.

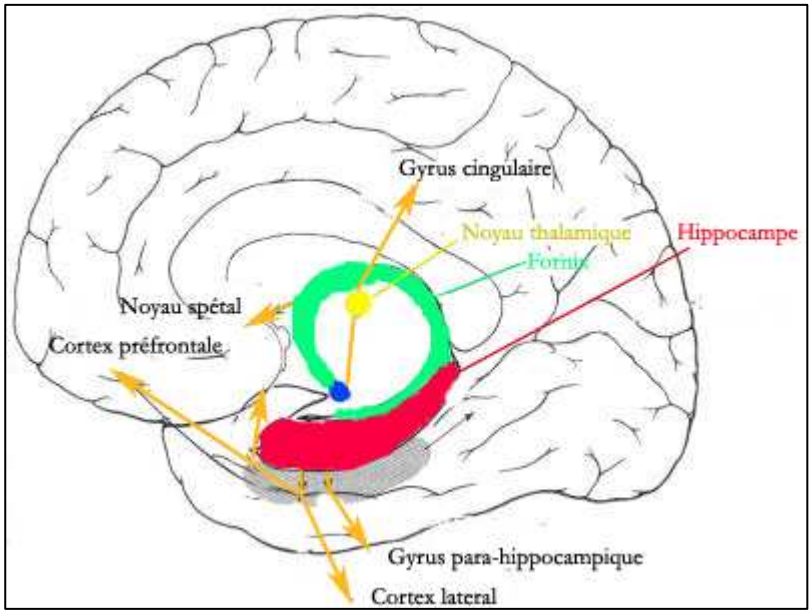


Figure 5 *: Efférences de l'hippocampe*

D'après Thèse Toni Nicolas

B.1.3 Fonctions de l'hippocampe

L'organisation neuro-anatomique de l'hippocampe diffère peu selon les espèces, suggérant un rôle essentiel dans le fonctionnement du système nerveux central. Les premières découvertes sur la fonction de l'hippocampe sont apparues grâce à l'observation de patients. Au cours du 19ème siècle, Aloïs Alzheimer, un neuroanatomiste allemand, observa des modifications morphologiques spécifiquement associées à une forme de démence amnésique. C'est dans l'hippocampe que ces changements étaient les plus notables. En 1950, l'importance de l'hippocampe dans la mémoire fut démontrée par Scoville et Milner en étudiant le patient H.M. qui développa une amnésie antérograde globale après l'ablation chirurgicale bilatérale des lobes temporaux inférieurs.

Depuis, des centaines de publications ont contribué à la connaissance du rôle de l'hippocampe dans la construction de la mémoire évènementielle complexe, ou mémoire épisodique.

B.2 Symptomatologie de l'épilepsie du lobe temporal

B.2.1 Symptômes cliniques

Les épisodes de crises sont souvent initiés par une **« aura »** décrite comme une perception de chaleur ou des sensations épigastriques, souvent associées à des sentiments d'angoisse et de peur (Engel, J., Jr. - *2001*). On peut retrouver chez certains patients des hallucinations olfactives, auditives ou même vestibulaires.

La **crise débute** avec une symptomatologie diverse : arrêt de l'activité, phénomènes végétatifs (pâleur, respiration courte), automatismes oro-alimentaires (mâchonnement, salivation), automatismes gestuels (grattage, frottement…), troubles phasiques ou automatismes verbaux.

Après les crises, les patients sont souvent désorientés au niveau temporel et spatial et présentent une amnésie de la crise mais pas forcement de l'aura.

L'état critique dure en général 2 minutes. Ces épilepsies sont très rarement secondairement généralisées.

Les différents symptômes peuvent s'expliquer par la localisation interne ou externe du foyer épileptique. En effet, quand la localisation est externe, on décrit des hallucinations, un arrêt de l'activité, des automatismes oro-alimentaires avec vocalisation et des automatismes verbaux. Au contraire dans l'épilepsie temporale interne, on observe des signes végétatifs, un arrêt de l'activité, une désorientation et une amnésie de la crise.

B.2.2 Investigations de l'épilepsie

B.2.2.1 L'électroencéphalogramme (EEG)

L'EEG, couplé à l'enregistrement vidéo, permet l'enregistrement en continu du comportement et de l'activité électrique du patient en phase inter- et per-critique. Ce monitoring permet le diagnostic de l'épilepsie. Il est aussi utilisé dans le bilan pré-chirurgical pour définir la zone irritative et la zone épileptogène. Cependant l'EEG est limité à l'enregistrement d'activités de surface et, dans certains cas, il n'est pas suffisant pour localiser le foyer. Il faut alors avoir recours à la stéréoEEG, c'est-à-dire l'enregistrement de structures profondes grâce à l'implantation chirurgicale d'électrodes (Figure 6).

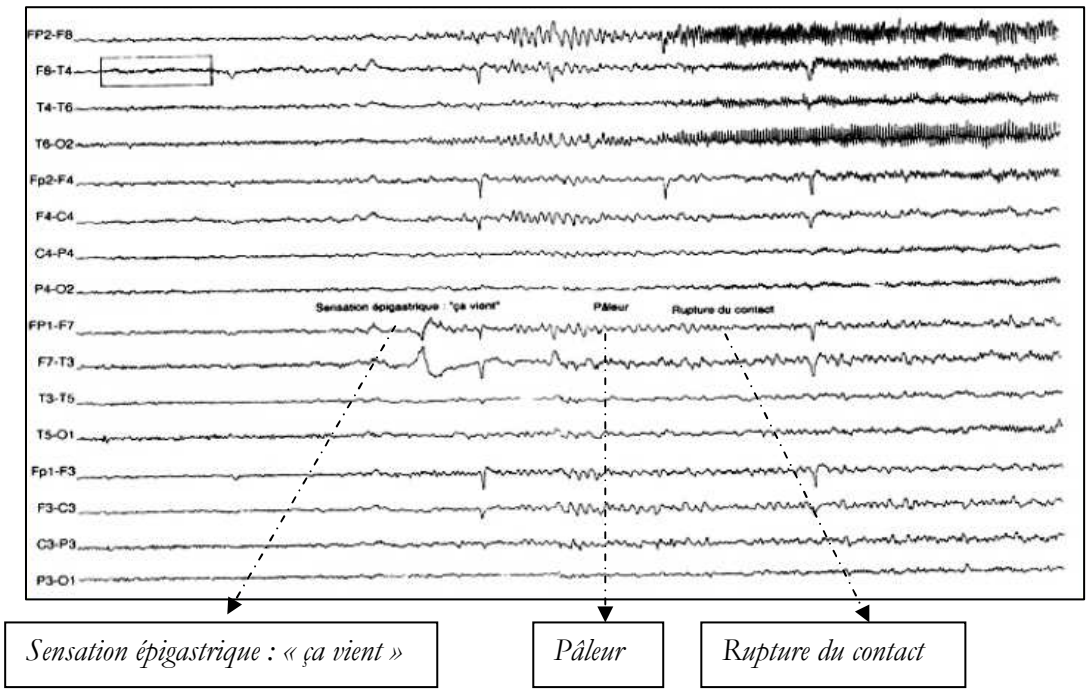


Figure 6 *: Exemple d'un tracé EEG d'une crise temporale*

B.2.2.2. L'imagerie

Le diagnostic des épilepsies est aussi précisé ou validé par l'imagerie morphologique et/ou fonctionnelle.

L'**IRM** (I*magerie par Résonance Magnétique*) a supplée le scanner dans le bilan des épilepsies réfractaires ou tardives et détecte certaines étiologies de l'ELT (tumeurs, malformations vasculaires, dysplasies corticales et scléroses hippocampiques).

L'imagerie fonctionnelle comporte toutes les techniques qui analysent l'état fonctionnel des différentes régions du cerveau, comme la neuro-imagerie isotopique, représentée par la TEM (T*omographie d'Emission Monophotonique*) ou SPECT (*Single Photon Emission Tomography*) et la TEP (*Tomographie d'Emission de Positions*) ou PET (*Position Emission Tomography*).

- La **SPECT** permet l'étude de la distribution loco-régionale du débit sanguin cérébral (DSC) et de la consommation de glucose donnant des informations directes sur l'activité fonctionnelle. En effet, le cerveau ne possédant pas de réserves énergétiques, la consommation de substrats énergétiques est directement liée et proportionnelle à l'activité du cerveau. Les marqueurs (hexaméthyl Propylène Amine Oxime (HMPAO) ou le diéthyl Cystéinate Dimer (ECD) se fixent dès leur injection, au tissu cérébral et restent stables une à trois heures. Le SPECT donne des

images en période inter-critique ou per-critique. Cette technique a permis d'observer, chez l'homme comme chez l'animal, une hyperperfusion et un hypo-métabolisme de la zone épileptogène pendant les crises ainsi qu'une hypoperfusion entre les crises (Figure 7).

- LA **PET** permet aussi d'analyser les variations du DSC et du métabolisme énergétique (glucose et oxygène), notamment avec le [2-18F]2-deoxy-2-fluoro-D-glucose ([18F]FDG).

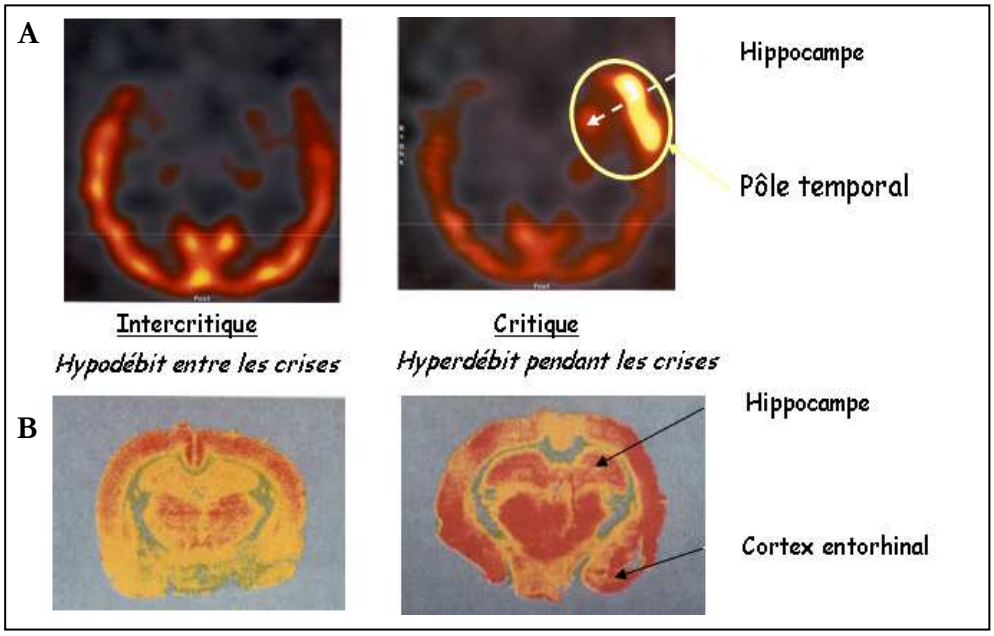


***Figure 7** : Variations du débit sanguin mises en évidence :*
A par la technique de SPECT HMPAO chez l'homme (Rigau, V., et al. - 2007)
B., par autoradiographie de I_{125} –isopropyl-iodo-amphetamine chez le rat (Lerner-Natoli, M., et al. - 1983)

La combinaison de ces deux types d'imagerie (SPECT pour le débit sanguin et PET pour la consommation du glucose) est utilisée dans le bilan pré-opératoire des épilepsies pharmacorésistantes pour localiser avec précision la zone épileptogène (Coubes, P., *et al. - 1993*).

B.2.3 L'épilepsie du lobe temporal, la forme la plus fréquente

L'épilepsie du lobe temporal est une forme d'épilepsie partielle complexe et très fréquente (0,3% de la population). Le foyer épileptique est l'hippocampe dans la majorité des cas. Le développement d'une ELT est classique et identique dans 80% des patients (Figure 8):

- Elle débute par un **évènement précoce** induisant des dommages cérébraux. Il s'agit le plus souvent de convulsions fébriles complexes pendant les 5 premières années de vie, mais aussi de ***Status epilepticus*** (SE) (crises continues de longue durée), de traumatismes crâniens, d'encéphalites, d'ischémies/anoxies.
- Ensuite, on décrit une **phase silencieuse** (en termes cliniques, donc sans crises), pendant laquelle se produisent de nombreux remodelages tissulaires: pertes neuronales, gliose, inflammation réorganisation synaptique, neurogénèse, migration neuronale, etc…. Ces processus participent à l'**épileptogenèse**, c'est-à-dire le développement progressif d'une hyperexcitabilité. On peut observer dans cette phase un déclin cognitif chez les patients.
- Au terme de quelques années, les premières crises apparaissent et se répètent. C'est la **phase chronique** de la maladie. La fréquence de ces crises est différente selon les patients, de quelques unes par an à plusieurs par jour, et répondent aux anti-épileptiques (AEDs) classiques. Les crises peuvent être accentuées par le stress, le manque de sommeil ou les variations hormonales. La fréquence des crises semble s'aggraver progressivement, justifiant l'adage des neurologues « la crise appelle la crise ».
- Les crises peuvent alors être contrôlées avec succès par les AEDs soit totalement (aucune progression de la maladie) soit partiellement (diminution de la sévérité ou de la fréquence). Cependant, dans certains cas, les patients deviennent progressivement **pharmacorésistants.** Les crises sont alors récurrentes et les dommages cognitifs aggravés. Le seul traitement possible est la chirurgie par ablation du foyer s'il est unique et accessible. Une chirurgie appropriée permet à 80-90% des patients d'être libres de crises (Mathern, G. W., *et al. - 1995,* Mathern, G. W., *et al. - 1995,* Picot, M. C., *et al. - 2008*)

Nous détaillerons plus loin les différentes étapes supposées du développement d'une ELT.

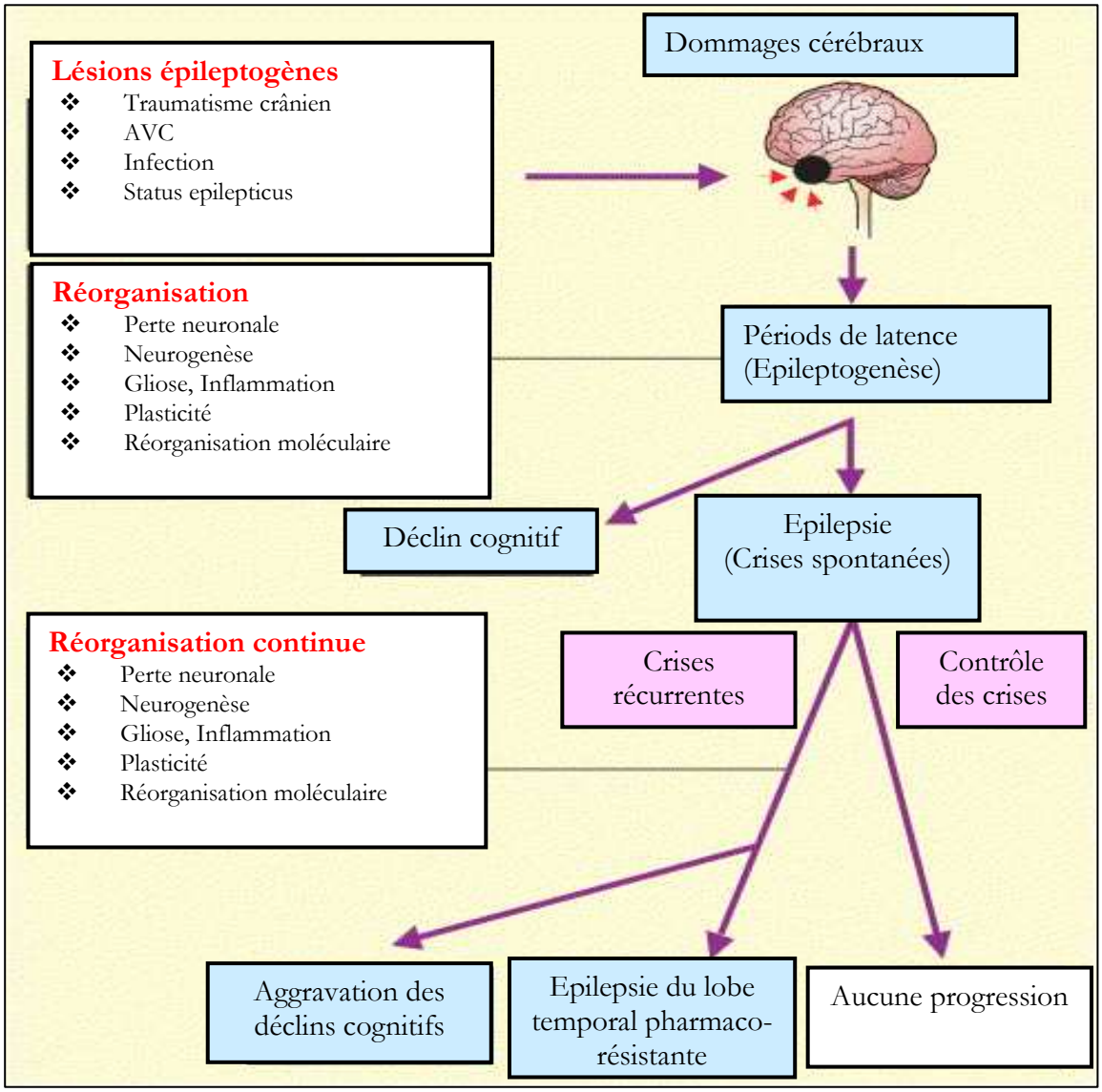


Figure 8 *: Décours temporel du développement d'une ELT.*

D'après (Pitkanen, A., et al. - 2002)

B.3 Etiologies des épilepsies du lobe temporal

Bien que les ELTs montrent un profil symptomatique assez identique, il existe un grand nombre d'étiologies différentes.

B.3.1 Sclérose de l'hippocampe

Dans 60% des cas l'épilepsie est associée à une sclérose de l'hippocampe. Elle a été décrite pour la première fois en 1825 par Bouchet et Cazauvieih mais les premières descriptions histologiques datent de 1880, par Sommer.

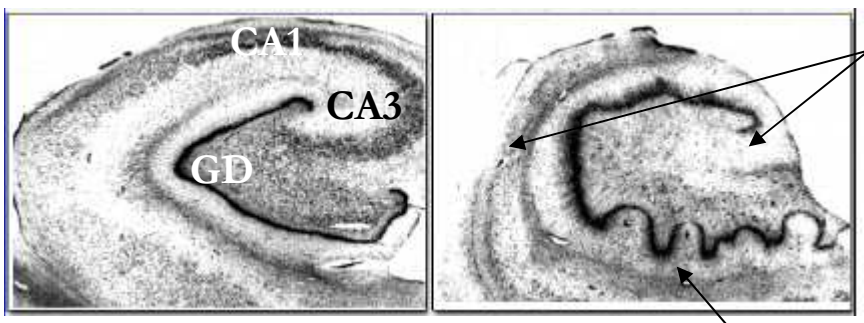
Cette lésion est secondaire à une **mort neuronale** intense localisée dans certaines aires bien définies de la couche pyramidale, de l'aire CA1 jusqu'au CA4 en épargnant le CA2.

Une **dispersion du GD** est observée chez les patients épileptiques. En effet, dans l'hippocampe sain, les cellules granulaires du GD forment une couche fine et régulière, qui s'élargit chez les patients épileptiques, par la migration ectopique de ces neurones, s'étendant parfois jusque dans la couche moléculaire.

Une **astrogliose** est associée à ces phénomènes. En effet des modifications morphologiques et fonctionnelles des cellules gliales ont été décrites. Les cellules gliales expriment des canaux ioniques et des récepteurs qui participent à l'excitabilité. Cette gliose réactionnelle confère sur un plan macroscopique un aspect dur et ferme de l'hippocampe, d'où le nom de sclérose de l'hippocampe attribué par Bouchet et Cazauvieih (Steinhauser, C., *et al. - 2002*) (Figure 8 et Figure 9).

On décrit aussi un **remodelage des circuits** de l'hippocampe, caractérisé notamment par une réorganisation synaptique. La perte des cellules moussues du hile provoque une déafférence des dendrites des cellules granulaires, un bourgeonnement aberrant des axones des cellules granulaires et des neurones GABAergiques, qui forment de nouvelles synapses. Cette synaptogenèse excessive modifie considérablement l'excitabilité du tissu.

L'étiologie majoritaire de la sclérose hippocampique associée à une ELT est la survenue de crises fébriles complexes avant l'âge de 4 ans (Lurton, D., *et al. - 1998,* Mathern, G. W., *et al. - 1995*). Les autres étiologies de la SH sont l'anoxie, l'ischémie ou encore un status epilepticus (état de mal épileptique).



Pertes neuronales (N. pyramidaux CA1, CA3, CA4, interneurones) associées à gliose sévère

Migration aberrante des neurones granulaires => épaississement : « dispersion du gyrus denté »

***Figure 9** : Comparaison entre hippocampe contrôle (photo de gauche) et un hippocampe de patient épileptique avec sclérose et dispersion du gyrus denté (photo de droite)*

B.3.2. Autres étiologies

Pour les 40% d'ELT sans sclérose hippocampique, les étiologies sont très diverses.

Les infections bactériennes ou virales touchent principalement les enfants et les adolescents Dans le cas d'**encéphalites** on retrouve une gliose et une inflammation importante mais pas forcement de pertes neuronales massives (Figure 10-C).

Les **accidents vasculaires cérébraux,** les **anoxies,** provoquent une lésion et une gliose, particulièrement dans l'aire CA1, parfois associée à une migration anormale des cellules granulaires restreinte (Figure 10-D).

Une épilepsie peut se développer à la suite d'un **traumatisme crânien**. Dans ce cas on rapporte des lésions, gliose et parfois une anomalie de migration majoritairement dans l'aire CA3.

Les **tumeurs** sont une étiologie relativement rare des épilepsies. On observe des crises dans 1% des cas chez les adolescents, 15% chez l'adulte et 10% chez les personnes âgées. Il est intéressant de noter que les tumeurs de bas grade sont les plus épileptogènes (Figure 10-E).

Une étiologie très étudiée actuellement est la **dysplasie**, malformation ou déformation résultant d'une anomalie de développement, particulièrement les dysplasies focales ou de Taylor. On suppose qu'une anomalie de migration des neurones est épileptogène (Figure 10-F).

Dans certains cas aucune anomalie est observée à l'histologie et on ne connaît pas l'étiologie, on parle alors d'épilepsie « **cryptogénique »**. Dans ce cas l'hippocampe est similaire à un hippocampe sain (Figure 10-G).

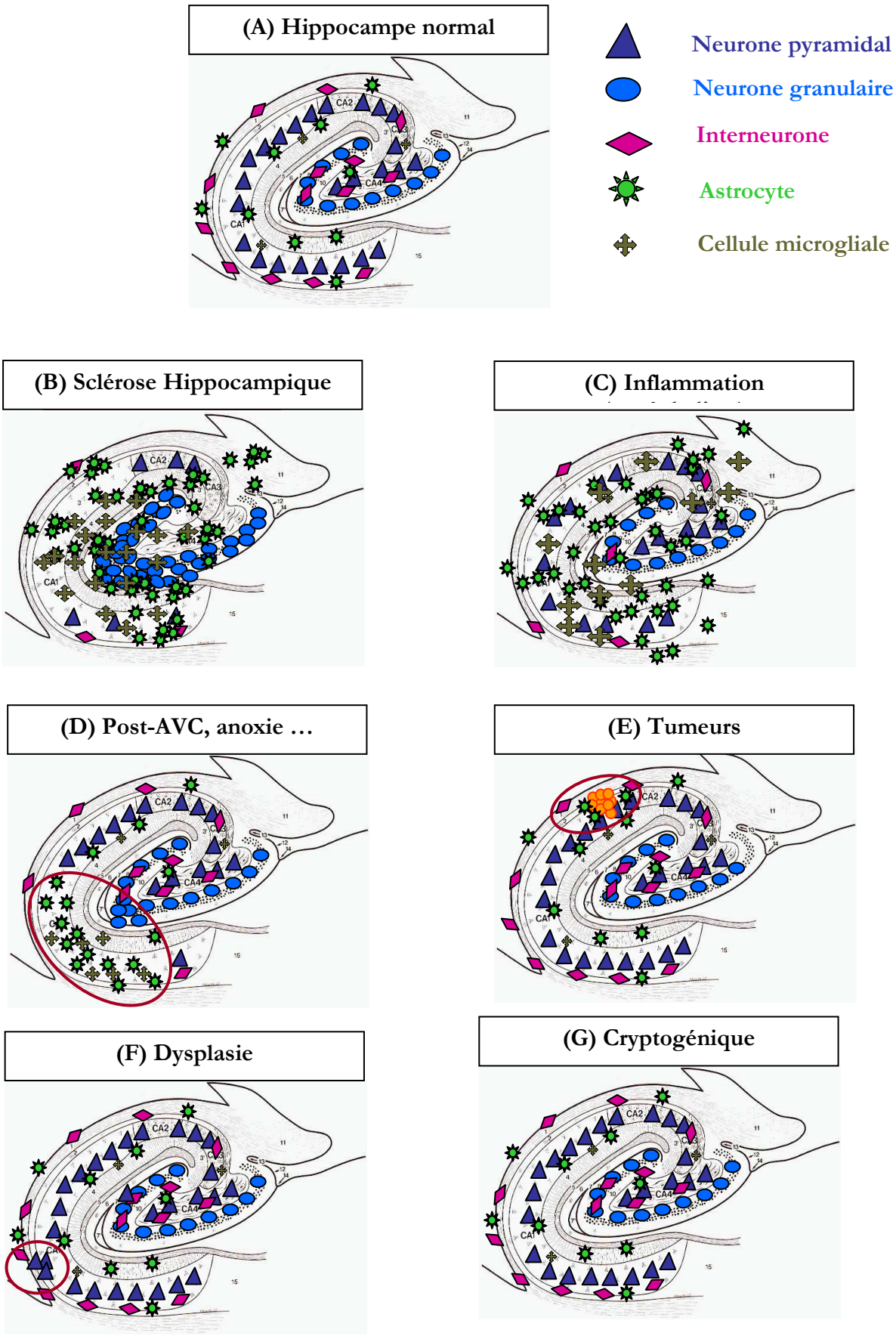


Figure 10 *: Différentes étiologies de l'épilepsie du lobe temporal*

Mireille Lerner-Natoli

B.4 Epileptogenèse (D'après Piktanen A, 2009)

B.4.1 Définitions

L'épileptogenèse se définit comme la capacité d'un tissu à devenir épileptique. Dans le cas des épilepsies symptomatiques, on situe l'épileptogenèse entre le facteur déclenchant (phase aiguë) et l'apparition des crises spontanées et récurrentes (phase chronique). Pendant cette période, appelée **période de latence ou silencieuse**, une cascade d'évènements se produit. L'épileptogenèse est multifactorielle, associant des facteurs acquis (fonctionnels ou lésionnels), prédominant dans les épilepsies symptomatiques, et des facteurs génétiques ou constitutionnels plutôt retrouvés dans les épilepsies idiopathiques (Figure 11).

La compréhension des processus épileptogènes repose sur le développement de nombreux modèles animaux. Les modèles qui reproduisent le mieux l'ELT sont ceux induits par un SE. Dans ces modèles, on retrouve au cours de l'épileptogenèse tous les évènements lésionnels, gliotiques, inflammatoires et les réorganisations tissulaires qu'on observe dans les foyers chroniques humains (Table 2).

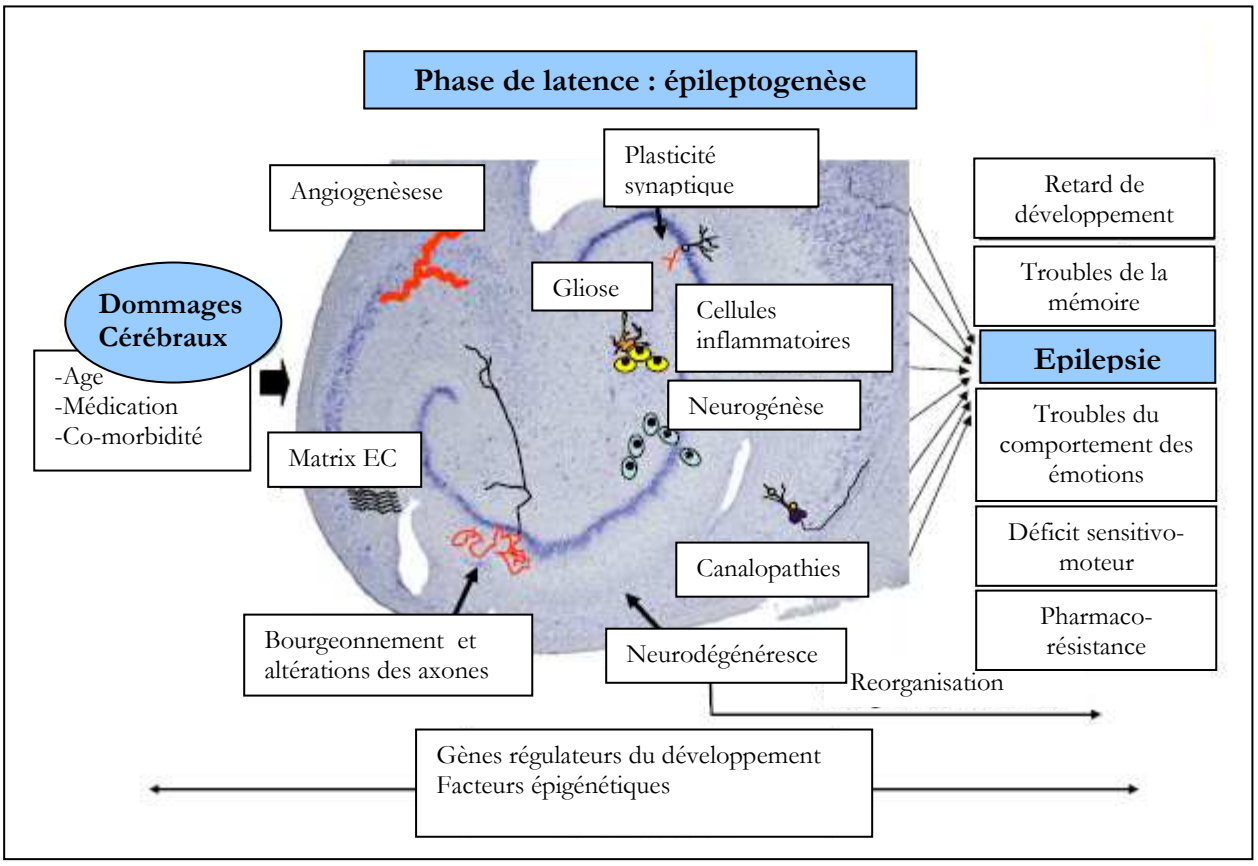


***Figure 11**: Mécanismes de l'épileptogenèse*

D'après (Pitkanen, A., et al. - 2009)

B.4.2 Modèle animaux d'ELT : compréhension de l'épileptogenèse

Les modèles animaux permettent de comprendre la physiopathologie de l'épilepsie. Les modèles doivent être :

1. homologues : identité de causalité et de mécanismes
2. isomorphes : symptômes similaires
3. prédictifs : même réponse aux médicaments que l'homme

Les modèles sont de plus en plus nombreux mais aucun n'est idéal dans l'étude de l'épileptogénèse. Cependant ils restent très complémentaires car certains apportent des informations sur les mécanismes fondamentaux de l'épilepsie et d'autres sont plus pertinents pour une approche plus pharmacologique (Table 2) (White, H. S. - *2002*).

B.4.2.1 Modèles induits *in vivo*

B.4.2.1.1 Le kindling ou « embrasement »

Le kindling a été décrit pour la première fois en 1967 par Goddard. Il est induit soit par des stimulations électriques sub-convulsivantes et répétées, soit par des électrodes implantées dans des structures limbiques (l'amygdale, hippocampe, bulbe olfactif ou cortex entorhinal), soit par l'injection systémique répétée de doses sub-convulsivantes de pentylenetetrazol (PTZ), un antagoniste des récepteurs GABA-A. La première stimulation (électrique ou chimique) provoque une crise très brève (quelques secondes). Au fur et à mesure des stimulations, le seuil d'excitabilité diminue, les crises s'allongent, se propagent à d'autres structures s'aggravent et se généralisent secondairement. La mort neuronale est quasi inexistante et le bourgeonnement est assez discret dans ce modèle. On retrouve par contre une augmentation de l'activation gliale.
On classe les crises selon une échelle de stades comportementaux, décrite pour la première fois par Racine en 1972 (Racine, R., *et al.* - *1972,* Racine, R. J. - *1972,* Racine, R. J. - *1972*)

	Kindling électrique	Kindling chimique
Stade 1	Clonies de la face	Clonies des yeux et de la face
Stade 2	Hochements de la tête	1 à 20 secousses myocloniques du corps en 10 minutes
Stade 3	Clonies des membres antérieurs	Plus de 20 secousses en 10 minutes
Stade 4	Redressement	Convulsions cloniques des membres antérieurs
Stade 5	Généralisation, redressement et chute	Généralisation

Table 3 *: Comparaison des différents stades entre kindling chimique et électrique*

Dans l'embrasement, les animaux ne développent pas de crises spontanées sauf dans de rares cas d' « over-kindling » après un nombre élevé de stimulations électriques (90 à 100 crises au-delà du stade 5) peut induire des crises spontanées (Morimoto, K., *et al. - 2004*).

La validité de ce modèle pour l'étude de l'ELT chronique est controversée, mais, en revanche, le kindling est pertinent pour l'étude des circuits impliqués et des mécanismes de plasticité dans la généralisation. L'embrasement est aussi utilisé pour tester les nouveaux AEDs (Bertram, E. - *2007*).

B.4.2.1.2 Les modèles de Status Epilepticus

Il s'agit le plus souvent de modèles lésionnels qui reproduisent le développement d'une ELT avec sclérose hippocampique. Le SE est induit par des agonistes des récepteurs ionotropes du glutamate (le kainate) ou de l'Acétylcholine (la pilocarpine). Les stimulations électriques prolongées du faisceau perforant ont un effet identique.

Le **kainate** a été le premier convulsivant chimique à être utilisé pour modéliser l'ELT (Ben-Ari, Y. - *1985*). Il peut-être injecté par voie systémique ou intracérébrale de façon à induire rapidement des crises, caractérisées par un changement de l'activité comportementale : stéréotypies, clonies plus ou moins généralisées. L'EEG indique que les crises durent plusieurs heures sans discontinuer. Après le SE, de nombreux changements observés sont identiques à ceux rapportés dans l'ELT (Figure 12):

1. Nécrose et mort neuronale dans l'aire CA1 et CA3 aet dans certains noyaux du thalamus et de l'amygdale
2. Bourgeonnement des fibres moussues
3. Astrogliose et microgliose importantes
4. Neurogénèse dans la couche sous-granulaire

La **pilocarpine** a été utilisée pour la première fois chez le rat (Turski, W. A., *et al. - 1983*) puis chez la souris (Fujikawa, D. G. - *2003*). Elle peut-être injectée par voie systémique ou intracérébrale. Elle produit des changements à peu près similaires de ceux induits par le kainate mais les crises et les dommages sont plus sévères.

La **stimulation électrique prolongée** est moins utilisée dans l'étude de l'ELT, bien que les signes cliniques et les lésions ressemblent à ceux des modèles « kainate » et « pilocarpine ». La stimulation pendant plusieurs heures des voies afférentes de l'hippocampe grâce à l'implantation d'électrodes dans le faisceau perforant induit un SE. La stimulation décrite par Vincedomini se fait par des pulses de 0,2 à 0,4 ms à une fréquence de 20 Hz (Vicedomini, J. P., *et al. - 1987*).

Dans ces différents modèles, des crises spontanées apparaissent deux à trois semaines après le SE. Ces modèles sont très utilisés pour étudier les mécanismes de la phase de latence, mais aussi de la phase chronique. Il est important de noter une différence importante par rapport à la pathogénèse humaine (White, H. S. - *2002*). En effet, un facteur déclenchant dans les ELT a lieu dans la petite enfance alors que le SE (quel que soit le modèle) n'induit une épilepsie chronique que chez des animaux d'âge supérieur à 3 semaines (Haas, K. Z., *et al. - 2001*).

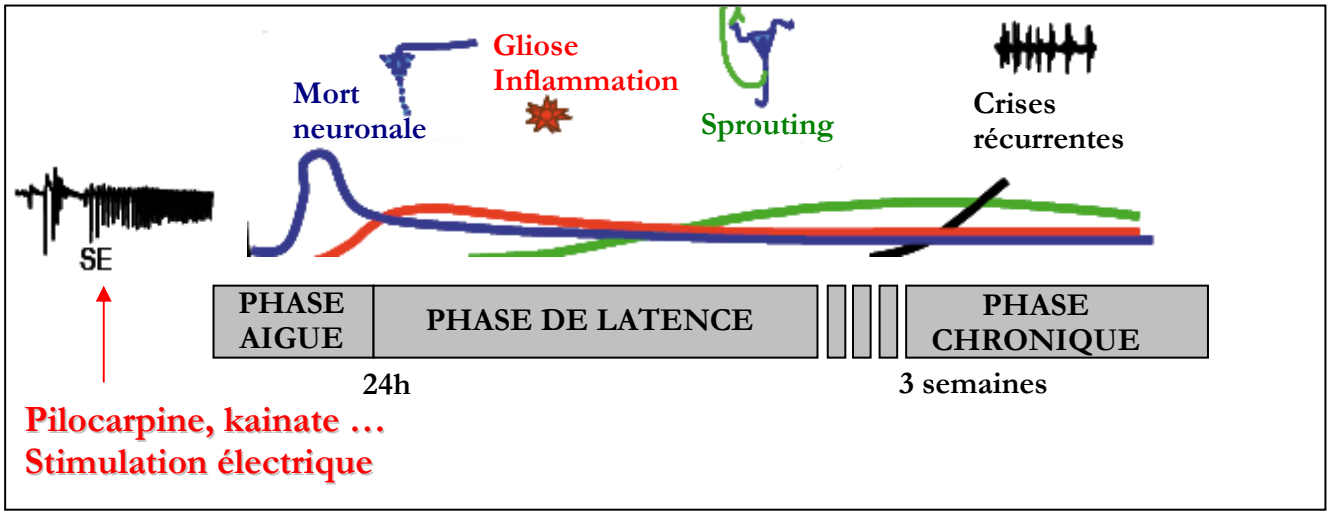


***Figure 12** : Schéma des modèles lésionnels*

B.4.2.1.3 L'hyperthermie

Beaucoup de patients adultes souffrant d'ELT ont eu dans leur histoire un épisode de convulsions fébriles. De ce fait plusieurs modèles d'hyperthermie ont été développés :

1. Une hyperthermie ambiante induit des crises chez des rats âgés de 6 à 10 jours (Holtzman, D., *et al. - 1981*)
2. L'énergie d'un micro-onde augmente la température corporelle de rats âgés de 13 à 17 jours, provoquant des convulsions semblables à celles observées chez l'homme (Hjeresen, D. L., *et al. - 1983*)
3. L'exposition de rats (de 10-11 jours) à de l'air chauffé à 43°C induit des crises chez 93% des animaux (Baram, T. Z., *et al. - 1997*)
4. L'immersion dans une piscine à 45°C induit des crises de 30s à 6 mn. La répétition de ces crises peut aboutir à un SE (Jiang, W., *et al. - 1999*)

Cependant, quel que soient le modèle, on n'observe, aucune lésion ni crises spontanées chez ces animaux. On n'a donc pas de vrai modèle d'épilepsie chronique après hyperthermie chez le jeune.

B.4.2.1.4 Autres modèles :

Modèles d'épilepsie post-traumatique

Un traumatisme crânien peut-être un facteur déclenchant d'ELT. Les modèles de trauma (augmentation de la pression hydraulique, choc) reproduisent fidèlement la pathologie humaine avec : mort neuronale et gliose dans l'hippocampe, et apparition de crises spontanées. Cependant, les crises spontanées ont le plus souvent leur origine dans le cortex frontal et se propagent vers les régions temporales, contrairement aux autres modèles d'ELT. Ces modèles sont peu utilisés à cause de leur forte mortalité et de la lourdeur du protocole (Sharma, A. K., *et al. - 2007*).

Modèles d'hypoxie ou d'ischémie périnatales

Des hypoxies induites sur des jeunes rats (10 à 12 jours) induisent des crises tonico-cloniques, une mort neuronale et un bourgeonnement des fibres moussues. Cependant aucune crise spontanée n'apparait.

B.4.2.2 Modèles génétiques d'épilepsie (D'après (Upton, N., *et al. - 2003*)

Les modèles génétiques permettent l'étude de l'excitabilité synaptique et de l'épilepsie. Il existe trois catégories de modèles génétiques :

1. Modèles spontanés d'épilepsie
2. Modèle « homologues » dans lesquels on génère dans des souris une mutation identifiée chez les patients épileptiques.
3. Des mutations de gènes impliqués dans le développement cérébral qui génèrent, entre autres, un phénotype épileptique « single gène ».

Modèles spontanés d'épilepsie

Il s'agit des premiers modèles d'épilepsie génétique chez la souris, le rat, le singe ou la poule. Ils ont permis de comprendre le rôle très important des canalopathies dans les épilepsies. On retrouve notamment un grand nombre de souris possédant des mutations au niveau des canaux calciques et présentant une épilepsie absence (Table 2). Il existe aussi 2 modèles de rats présentant spontanément des crises de type absence : le GAERS et Wag-Rij (*WAG/Rij*) mais le génome de rat n'étant pas complètement ne permet pas de connaître les éventuelles mutations. Cependant ces deux modèles sont extrêmement explorés en électrophysiologie et pharmacologie (Danober, L., *et al. - 1998,* Van Luijtelaar, G., *et al. - 2006*).

Modèles « homologues »

Une douzaine de loci ont été découverts chez les patients souffrant d'épilepsie familiale et pour cinq de ces gènes on a généré la mutation. La plus importante est la mutation « gain de fonction » des canaux Na+ : Scn2a. À partir de 2 mois, on observe chez ces souris des crises associées à des pertes cellulaires au niveau des aires CA1 et CA3 et une gliose (Kearney, J. A., *et al. - 2001*). De plus ces crises répondent aux AEDs qui inhibent les canaux Na+ comme la phénytoine ou la carbamazepine (Meisler, M. H., *et al. - 2001*) (Table 2).

Modèles mutations « single genes »

Ces modèles sont très importants pour « disséquer » les phénomènes d'épileptogenèse. Ils ont permis d'identifier 20 autres gènes capables de générer des épilepsies. Ce sont particulièrement des gènes intervenant dans la formation ou la fonction des synapses comme :

1. Transporteurs des neurotransmetteurs (GABA, glutamate) (Kash, S. F., *et al. - 1997,* Prosser, H. M., *et al. - 2001,* Tanaka, K., *et al. - 1997*)
2. Facteur neurotrophiques, neuronaux ou astrocytaires (Kokaia, M., *et al. - 1995,* Uhlmann, E. J., *et al. - 2002*)
3. Relargage des neurotransmetteurs (Rosahl, T. W., *et al. - 1995*)

(Table 2)

B.4.2.3 Modèles de rats pharmacorésistants

En 1998, l'équipe de Löscher mit en évidence chez des rats « kindlés » un groupe d'animaux ne répondant pas à la phénytoine ni au phénobarbital (Bethmann, K., *et al. - 2007,* Loscher, W., *et al. - 1998*). Ce groupe de rats a été isolé et utilisé pour étudier les phénomènes de pharmacorésistance en comparant les rats sensibles aux rats résistants. Dans un premier temps, on n'a pas pu mettre en évidence des différences de sensibilité des canaux Na+ pour la phénytoine (Jeub, M., *et al. - 2002*). De plus aucun variant génétique du gène *MDR1* n'a été trouvé chez ces rats (Baars, C., *et al. - 2006*). La seule particularité de ces rats connue à l'heure actuelle est un niveau d'expression plus important de MDR1 ou P-glycoproteine (Pgp) au niveau des cellules endothéliales (Potschka, H., *et al. - 2004*). Les études portent maintenant sur la régulation de l'expression de ce transporteur.

B.4.2.4 Modèles *in vitro*

On distingue deux grands modèles *in vitro* dans l'étude de l'épilepsie : les modèles aigus de crises et les modèles chroniques d'épileptogenèse. Bien entendu, chacun a des applications distinctes (Table 2).

B.4.2.4.1 Modèles aigus

Il consiste à prélever des tranches d'hippocampe ou de cortex chez des rongeurs adultes naïfs, épileptiques ou transgéniques. Ces tranches conservent l'organisation laminaire du tissu, permettant d'enregistrer l'activité électrique des neurones (Armstrong, D. L. - *1991*). On peut mesurer l'hyperexcitabilité et la synchronisation des neurones ainsi que la propagation des crises (Jensen, F. E., *et al. - 1996*). De plus, l'approche pharmacologique est très facile dans ces conditions et permet une compréhension plus détaillée des mécanismes impliqués pendant de crises (Esclapez, M., *et al. - 1997*).

Il est important de noter que cette technique peut-être appliquée à des tissus humains provenant de la chirurgie des épilepsies pharmacorésistantes (Cohen, I., *et al. - 2002*)

B.4.2.4.2 Modèles chroniques

Cellules nerveuses isolées

Ces cultures primaires peuvent être des neurones d'hippocampe, de cortex ou encore de cervelet, prélevées sur des fœtus de rats, souris sauvages ou transgéniques. Il existe aussi des lignées cellulaires de neurones ou d'astrocytes. Des activités de pointes à haute fréquence peuvent être induites en provoquant une dépolarisation (diminution de la concentration en Mg2+ du milieu de culture). Elles permettent surtout une approche d'électrophysiologie moléculaire (patch-clamp) des canaux impliqués dans l'hyperexcitabilité. L'approche pharmacologique est facile d'accès avec ces modèles (Eichler, S. A., *et al. - 2008*).

Des cultures d'ovocytes de xénope sont aussi utilisés pour une électrophysiologie sélective, en transfectant ces cellules avec des canaux ou récepteurs sauvages ou mutés. Il est même possible d'insérer dans la membrane des ovocytes des canaux ou récepteurs provenant de tissu humain épileptique et d'en étudier leurs particularités (Palma, E., *et al. - 2002*)

Co-cultures

On utilise aussi des modèles de co-culture (neurones-astocytes ; astrocytes-cellules endothéliales) pour l'étude de, la régulation de l'activité neuronale (Perego, C., *et al. - 2000*), l'excitotoxicité (Whitney, K. D., *et al. - 2000*) ou encore la pharmacorésistance (Cucullo, L., *et al. - 2007*).

Explants

Les explants sont très utilisés dans l'étude de l'épilepsie. Il s'agit le plus souvent de tranches d'hippocampe ou de cortex prélevées chez les jeunes rongeurs. Ces tranches survivent et se développent pendant plusieurs semaines en conservant tous les types cellulaires et leurs connexions (Holopainen, I. E. - *2005*). On peut créer sur ces explants des crises mimant l'ELT avec du kainate. On retrouve alors, comme *in vivo*, des décharges naissant dans l'aire CA3, se propageant dans l'aire CA1, puis une mort neuronale, du bourgeonnement et une gliose (Figure 13).

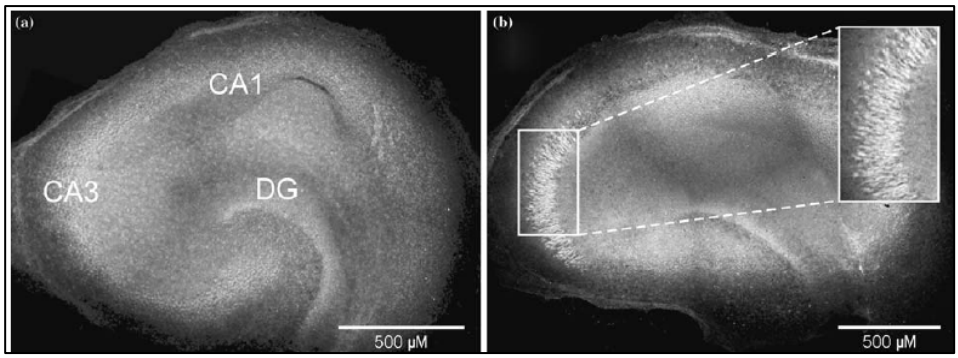


Figure 13 *: Tranches organotypiques d'hippocampe marquées au fluorojade (marqueur de mort neuronale). A. culture contrôle B. Culture après crises (kainate)*
D'après (Holopainen, I. E. - 2005)

Le grand avantage de ce modèle, en comparaison aux modèles aigus qui conservent aussi tous les types cellulaires, est l'étude des remaniements tissulaires à distance des crises, mais aussi le métabolisme et la sécrétion de facteurs trophiques ou inflammatoires. Il permet donc une approche facile des phénomènes à long terme observés lors de l'épileptogenèse (De Bock, F., *et al. - 1996,* Montpied, P., *et al. - 2003*).

B.4.3 Mécanismes de l'épileptogenèse connus

B.4.3.1 Facteurs génétiques

B.4.3.1.1 Mécanismes épigénétiques

Le terme épigénétique réfère à des changements dans les gènes sans affecter la séquence d'ADN. Il s'agit de modifications telles que des méthylations ou acétylations des histones influençant fortement l'expression des gènes qui ont donc une importance dans les fonctions cellulaires. On observe notamment ces modifications d'histones au niveau de gènes impliqués dans la plasticité neuronale. Le changement d'expression de ces gènes se révèle être épileptogène. Nous pouvons citer en exemple la déacétylation des histones du promoteur de GLUR2 qui induit une diminution de son expression, augmentant ainsi l'épileptogenèse (Huang, Y., *et al. - 2002*).

B.4.3.1.2 Les origines génétiques

A la suite d'un SE, l'épiletogenèse (capacité à développer une épilepsie chronique) est très différente selon les souches de souris indiquant donc une sensibilité génétique à l'épilepsie (Schauwecker, P. E. - *2007*). Chez l'homme, comme chez la souris, une seule mutation d'un gène peut être associée à une épilepsie focale (Winawer, M. R., *et al. - 2007*). Les gènes mutés ne sont

pas liés à des canalopathies mais codent pour des protéines impliquées dans la migration cellulaire, des transporteurs ou des protéines vésiculaires (Witgen, B. M., *et al. - 2006*).

B.4.3.2 Facteurs acquis : altérations cellulaires ou moléculaires

B.4.3.2.1 Neurodégénérescence

La mort neuronale a été décrite au début du 19ème siècle, elle reste actuellement le facteur le mieux décrit dans l'épileptogénèse. La question de la mort neuronale comme cause ou conséquence de la maladie épileptique est toujours débattue. Au cours des années 1990, il a été démontré qu'une crise est capable d'engendrer la mort neuronale par le processus d'excitotoxicité.

On la décrit dans le hile, dans la couche pyramidale de l'aire CA1 et elle affecte particulièrement les interneurones. On la retrouve aussi dans les aires CA3, CA2 et GD en plus faible proportion. La neurodégénérescence est aussi observée dans le cortex entorhinal, l'amygdale et le thalamus.
Beaucoup de facteurs sont impliqués dans la mort neuronale lors d'une crise d'épilepsie, (Heinemann, U. - *2004*) : un dysfonctionnement mitochondrial avec incapacité de produire l'ATP nécessaire à la restauration du gradient électrochimique entraîne une mort neuronale significative (Kunz, W. S. - *2002*). La production de radicaux libres (ROS) par les mitochondries augmente lors de crises récurrentes. La protection contre les dommages causés par les ROS réduit la mort neuronale induite par les crises, soulignant l'importance de ces radicaux dans la neurodégénérescence (Kovacs, R., *et al. - 2002*).

Récemment, des études *in vivo* ont montré que le SE est impliqué dans la neurodégénérescence et non la récurrence des crises épileptiques (Gorter, J. A., *et al. - 2003,* Pitkanen, A., *et al. - 2002*) et suggèrent l'existence de deux formes de mort neuronale : i) une phase aigue dépendante du SE, ii) une phase tardive ou prolongée dépendante des crises récurrentes.
La neuroprotection a longtemps été considérée comme la clé dans la prévention de l'épileptogénèse. Cependant la protection de la mort neuronale à la suite d'un SE ne prévient pas l'apparition de crises récurrentes mais elle permet une meilleure récupération après un SE (Brandt, C., *et al. - 2003*).

B.4.3.2.2 Neurogénèse

La présence d'une neurogénèse chez l'adulte dans la couche sous-granulaire du gyrus denté a été décrite il y a 10 ans par Eriksson. Le processus de neurogénèse débute par la prolifération des

cellules souches neurales ou progéniteurs. Dans le gyrus denté, ces progéniteurs donnent place à des cellules granulaires (DGCs). Les DGCs résident dans la zone sous-granulaire (SGZ) qui borde le hile et la couche de cellules granulaires. En condition physiologique, les DGCs intègrent sans aucune aberration la couche granulaire et connecte avec l'aire CA3 via les fibres moussues. La neurogenèse est régulée de façon négative par le stress et l'âge et de façon positive par l'exercice. Elle implique un grand nombre de facteurs de croissance comme le bFGF (*basic Fibroblast growth factor*), l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor)*, le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor)* ou encore le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*). Certains neurotransmetteurs augmentent ce phénomène comme le GABA ou la sérotonine, à l'inverse du glutamate (Parent, J. M., *et al. - 2007*).

La neurogenèse se fait dans un microenvironnement spécifique appelé la niche vasculaire. Cette niche contient différentes cellules : les progéniteurs, les astrocytes, les microvaisseaux et la microglie. Il est connu que les astrocytes sont nécessaires pour la prolifération, la différentiation et la migration. Le recrutement vasculaire dans ces niches favorise la neurogenèse. En effet l'endothélium des micro-vaisseaux du cerveau secrète du BDNF favorisant ainsi la survie et la différentiation des précurseurs neurogliaux (Palmer, T. D., *et al. - 2000*).

Dans l'ELT avec sclérose hippocampique, on a décrit une neurogénèse excessive. Les cellules immatures prolifèrent dans trois zones : couches subgranulaire, subventriculaire et fissure hippocampique (Crespel, A., *et al. - 2005*).

L'utilisation de plusieurs modèles *in vivo* d'ELT a pu révéler que des crises prolongées ou un SE étaient capables de stimuler la prolifération DGCs. La neurogenèse dans l'ELT participe à l'épileptogenèse de plusieurs façons (Figure 14) :

- Les nouvelles DGS développent des axones contribuant à une réorganisation aberrante des fibres moussues au niveau de l'aire CA3 et de la couche du GD (Scharfman, H. E., *et al. - 2000*).
- les DGCs migrent de façon aberrante vers le hile. Cette migration aberrante pourrait s'expliquer par une baisse de la reeline, protéine impliquée dans la guidance des cellules. Les DGCs sont alors hyperexcitables et induisent des bursts anormaux synchronisés vers l'aire CA3 participant aussi à un circuit épileptique.

Les mécanismes par lesquelles une crise d'épilepsie déclenche la neurogénèse ne sont pas encore totalement élucidés. Plusieurs hypothèses sont actuellement en vigueur :

- Les crises augmentent l'expression de facteurs impliqués dans la neurogenèse comme IGF-1, BDNF mais aussi des facteurs angiogéniques comme le VEGF (Aberg, M. A., *et al. - 2000,* Binder, D. K., *et al. - 2001*)
- La neurogenèse serait indirectement déclenchée par l'activation des astrocytes
- La mort de quelques DGCs matures pourrait déclencher un signal d'activation pour la formation de nouvelles cellules.

Des facteurs épileptogéniques, comme les AVCs (*Accidents Vasculaire Cérébraux)* ou le traumatisme crânien, induisent une neurogenèse ce qui pourrait expliquer les défaillances de mémoire et la dépression. (Pitkanen, A., *et al. - 2009,* Scharfman, H. E., *et al. - 2007*).

Il est intéressant de noter que chez les patients atteints d'ELT avec SH, les progéniteurs ne semblent pas toujours évoluer en neurones mais plutôt en astrocytes immatures, qui participent à l'excitabilité et la synchronisation (Crespel, A., *et al. - 2005*). Chez l'animal, on constate aussi un environnement inflammatoire, fatal pour les neurones néo-formés.
La destinée cellulaire des progéniteurs neuraux semble donc très dépendante de l'environnement en facteurs trophiques ou inflammatoires.

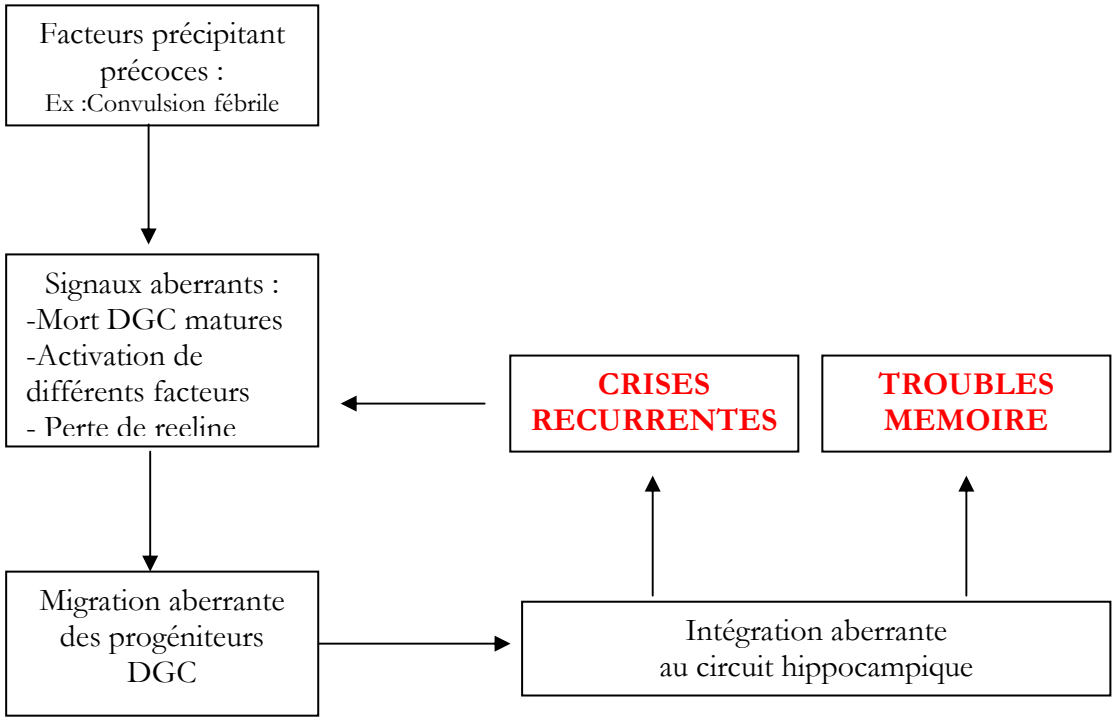


Figure 14 : *Boucle neurogenèse et épileptogenèse*

B.4.3.2.3 Modifications axonales et dendritiques

De nombreuses études décrivent une **plasticité axonale** à la suite de crises épileptiques. Le bourgeonnement des fibres moussues est le plus largement étudié, mais on retrouve aussi ce phénomène au niveau des axones des neurones pyramidaux de CA1 et des neurones inhibiteurs GABAergiques. Le rôle du bourgeonnement dans l'épileptogenèse lui aussi est controversé. Il pourrait être impliqué dans la régénération pour compenser les voies hippocampiques disparues.
On retrouve aussi une augmentation des **« blessures axonales »** quelques heures après le facteur précipitant et jusqu'à un an après. Ceci pourrait participer à la propagation des activités électriques.
Une **altération dendritique** est aussi retrouvée chez les patients atteints d'ELT : une perte, un changement morphologique des épines dendritiques, mais aussi des une réduction des branchements dendritiques qui affecterait la disponibilité de nombreux récepteurs

B.4.3.2.4 Gliose

Les cellules gliales comprennent les astrocytes, la microglie, les oligendendrocytes et les cellules NG2 ou polydendrocytes. Ces cellules sont nécessaires pour le maintien de l'homéostasie de l'eau et des ions, la régulation de la neurotransmission et des réponses inflammatoires.
En conditions physiologiques, les **astrocytes** assurent la recapture du glutamate et la régulation de l'environnement ionique notamment en tamponnant le potassium extracellulaire et en contrôlant les entrées d'eau par les aquaporines. Ces fonctions ne sont plus assurées dans les foyers épileptiques, du fait :

- d'altérations de la clearance du glutamate par les transporteurs astrocytaires dans les foyers humains,
- d'un relarguage astrocytaire du glutamate par exocytose calcium-dépendante,
- d'une dérégulation du pouvoir tampon des astrocytes pour le potassium, attribuée à une redistribution des canaux Kir4.1,
- d'une surexpression de l'aquaporine 4 (ACQP-4) qui provoque un gonflement des astrocytes (Wetherington, J., *et al. - 2008*). Ces modifications du fonctionnement astrocytaire provoquent une augmentation de l'excitabilité des neurones environnants, créant une condition épileptogène.

Les astrocytes sécrètent des facteurs trophiques tels que BDNF et FGF2 (*Fibroblaste Growth Factor)*, dont les effets « réparateurs » sont bénéfiques pour les neurones ; cependant, ils peuvent

aussi participer à la « plasticité épileptogène » (bourgeonnement, synaptogenèse etc…) comme l'ont souligné Binder et al ; dans une revue intitulée « BDNF and epilepsy: too much of a good thing? » (Binder, D. K., *et al. - 2001*)

Les astrocytes libèrent aussi différents facteurs inflammatoires. Plusieurs études montrent que les crises induisent la transcription et l'expression de nombreuses cytokines (notamment TNF-α (*Tumor Necrosis Factor*) et IL-1β (*Interleukine-1 béta),* qui ont des effets épileptogènes en modifiant l'activité des récepteurs NMDA (*N-méthyl-D-aspartate*) et AMPA (*a-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate*) (De Simoni, M. G., *et al. - 2000,* Vezzani, A., *et al. - 2007*).

La **microglie** est très sensible et répond très rapidement aux modifications de l'activité neuronale. La microgliose implique la prolifération, la migration et la sécrétion de nombreux facteurs délétères pour les neurones : les cytokines (TNF-α, IL-1β) (Ravizza, T., *et al. - 2008*) mais aussi les facteurs stimulants de colonies, qui accélèrent la prolifération gliale, des protéases, des radicaux libres et le monoxyde d'azote (NO). Cependant certains de ces facteurs sécrétés par la microglie, sont aussi réparateurs donc nécessaires pour la récupération fonctionnelle des neurones. De plus, la microglie, véritable macrophage du cerveau, exprime différents antigènes de surface et participe à réponse immunitaire innée (Turrin, N. P., *et al. - 2004*).

B.4.3.2.5 « Canalopathies acquises »

A la suite du facteur précipitant certains canaux ioniques dépendants soit du voltage soit d'un neurotransmetteur, sont modifiés. Ces changements apparaissent après quelques semaines et abaissent le seuil d'apparition des crises. Les « canalopathies acquises » peuvent affecter les dendrites, les régions perisomatiques et les axones. La possibilité d'avoir plusieurs canalopathies sur un même neurone n'est pas encore démontrée (Pitkanen, A., *et al. - 2009*) (Figure 15).

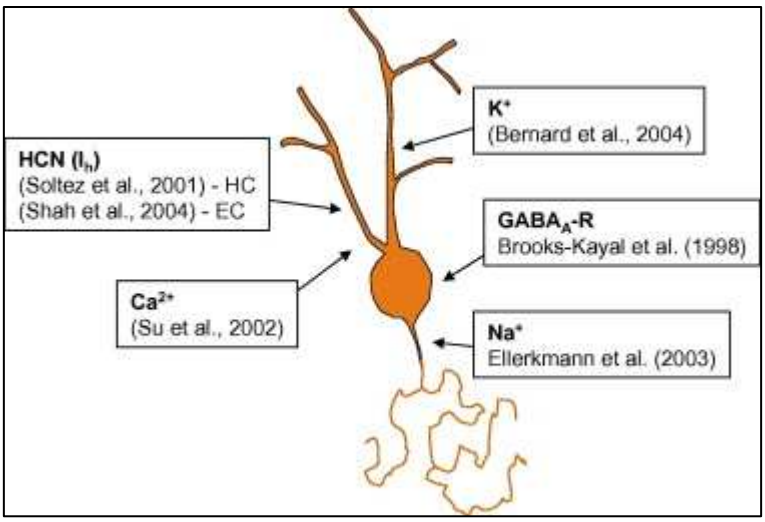


Figure 15 *: Canalopathies acquises*

D'après (Pitkanen, A., et al. - 2009)

B.4.3.2.6 Angiogenèse et changement dans la matrice extracellulaire

Une activité critique prolongée active l'expression de facteurs angiogéniques qui induisent une augmentation de la densité vasculaire (Hunsberger, J. G., *et al. - 2005,* Newton, S. S., *et al. - 2003*). Après une crise, on observe d'importants remodelages vasculaires, impliquant des changements de la matrice extracellulaire (ECM). L'étude des profils moléculaires montre une régulation des enzymes impliquées dans la dégradation et le remodelage de l'ECM, particulièrement le système plasminogène et les métalloprotéases (Lukasiuk, K., *et al. - 2003*).

C. La pharmacorésistance

C.1 Définition

La pharmaco-résistance est définie comme la capacité des cellules à développer une résistance vis-à-vis des médicaments auxquelles elles ont été préalablement exposées. Cette résistance devient souvent « multi-drogues », s'étendant à des molécules de structure et de fonctions différentes. La pharmaco-résistance touche de nombreuses maladies, comme le cancer ou le neuro-sida. La réponse aux médicaments est déterminée par l'interaction de plusieurs produits de gènes impliqués dans la pharmacocinétique et la pharmacodynamique, incluant les enzymes métabolisant les médicaments, leurs transporteurs et leurs cibles. L'altération intrinsèque ou acquise de ces gènes peut entrainer une pharmaco-résistance. Le phénomène de résistance est très complexe dont on connaît au moins trois mécanismes pourraient être impliqués :

- La variabilité du génome : par exemple, des polymorphismes menant à des altérations du métabolisme, de la cible ou des transporteurs

- Les mécanismes relatifs à la maladie elle-même incluant l'étiologie, les dommages cérébraux, l'altération des cibles des médicaments, la modification du réseau …
- Les mécanismes relatifs aux médicaments eux-mêmes comme la perte d'efficacité, la tolérance métabolique ou encore l'inefficacité des médicaments.

Le mécanisme le plus étudié et le plus connu de la pharmacorésistance est celui des transporteurs multi-drogues qui constituent ce que l'on appelle la deuxième barrière du cerveau (Loscher, W., *et al. - 2005*).

C.2 Les transporteurs multi-drogues (D'après Loscher, W., *et al. - 2005*)

Cinquante à mille deux cents gènes du génome humain codent pour des transporteurs de drogues. Ces derniers ont un impact important sur la pharmacologie en affectant l'absorbance, la disposition et l'élimination par le corps des médicaments. Ces transporteurs font partie d'une large famille appelée transporteurs ATP-binding cassette (ABC) retrouvés dans de la plupart des organes.

Les protéines ABC sont présentes dans tous les organismes vivants, avec une structure très conservée de la bactérie à l'homme. La structure de base est la combinaison de domaines liant l'ATP (NBDs) et de domaines transmembranaires (TMDs). Chez les mammifères, on décrit 2 TMDs ainsi que 2 NBDs reliés par une chaine polypeptidique, la dimérisation étant nécessaire à son activité. La liaison d'ATP permet de fournir l'énergie nécessaire au transport des drogues, alors que les TMDs jouent un rôle dans la reconnaissance des substrats (Figure 16).

Les protéines ABC sont divisées en plusieurs familles, en fonction de l'organisation des domaines et de l'homologie des acides aminés. On retrouve 7 familles : ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG, avec des fonctions physiologiques différentes. Au niveau de la résistance aux médicaments les transporteurs les plus représentés et étudiés sont : ABCB1 ou MDR-1, ABCC ou MRP (*multidrug resistance-associated protein*) et ABCG2 ou BCRP (*breast cancer resistance protein*) (Glavinas, H., *et al. - 2004*). Ces transporteurs sont présents dans le cerveau, plus particulièrement au niveau de la BHE et de la barrière sang-fluide cerebrospinal (CSF).

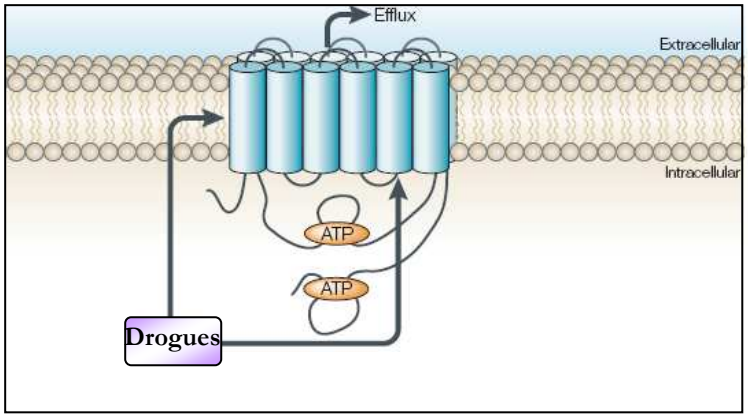


***Figure 16**: Structure des transporteurs multidrogues*
D'après (Loscher, W. - 2005)

C.2.1 Multidug-resistance-1, MDR1

C.2.1.1 Structure

MDR-1, connu aussi sous le nom de P-glycoprotéine (Pgp), a été le premier décrit, en 1970, dans la résistance aux traitements du cancer (Juliano, R. L. - *1976*). Présent dans plusieurs organes (foie, glande surrénale), il a été observé le premier dans les cellules endothéliales de la BHE, en 1989. Pgp est une glycoprotéine de 170 kD responsable de l'efflux de nombreux composés lipophiles comme les médicaments anti-cancereux ou les antidépresseurs.
Chez l'homme il existe deux types de Pgp : I et II. Le type I est impliqué dans la pharmacorésistance, comme son homologue chez les rongeurs (MDR-1). Il est constitué de 2 domaines transmembranaires et de 2 sites de liaisons pour l'ATP (Figure 17).

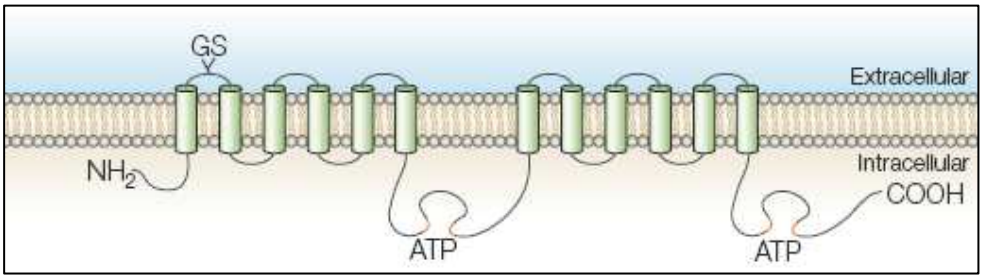


***Figure 17** : Structure de Pgp*
D'après (Loscher, W. - 2005)

C.2.1.2 Régulation du gène mdr

Le promoteur de mdr1 possède un nombre important de sites de liaisons des facteurs de transcription, AP-1 (*activator complex protein*), Sp1, AP-2, NF-IL-6 (*nuclear Facteur IL-6*), activés par les signaux de stress tels que les chocs thermiques, l'irradiation ou l'inflammation.
Les chocs thermiques induisent une surexpression de Pgp permettant de protéger les tissus des métabolites toxiques. Cette surexpression dépend du facteur de transcription AP-1, activé par les MAPkinases ou du NF-Y, activé lors d'irradiation.
L'inflammation aiguë et chronique ont des effets différents dans l'expression de ce transporteurs. En effet, l'inflammation aiguë diminue le nombre de transporteurs, notamment au niveau du foie. Cependant dans l'inflammation chronique la transcription est augmentée. En phase aiguë les cytokines impliquées dans la régulation sont majoritairement IL-1β, IL-6, TNF-α impliquant les facteurs de transcription AP-1 et NF-IL6 activés par les MAPkinase. Les voies Jak/STAT et NFkB (*nuclear factor-kappa B*) ont aussi été proposées. L'induction des gènes MDR dans le cas d'inflammation chronique n'est pas encore connue (Ho, E. A., *et al. - 2006,* Sukhai, M., *et al. - 2000*) (Figure 18).

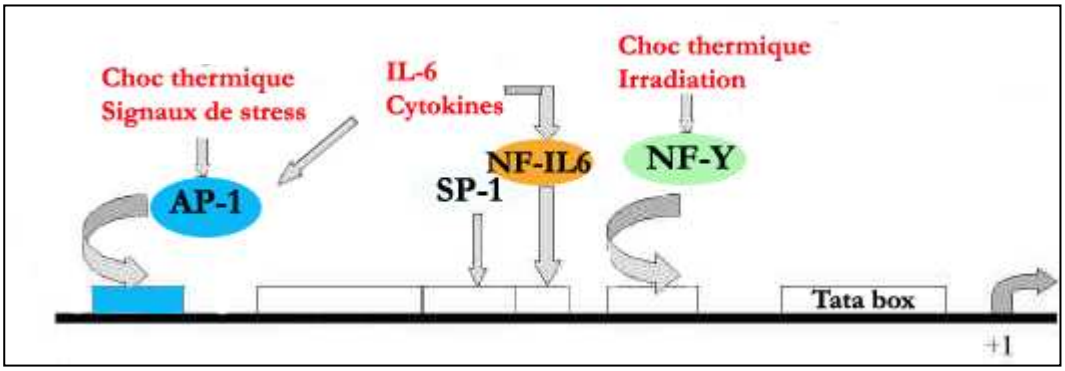


***Figure 18**: Promoteur MDR1 de la souris. Principaux sites de régulation de la transcription*
D'après (Sukhai, M., et al. - 2000)

C.2.1.3 Localisation, mécanismes d'action et pathologies

Dans le cerveau, la protéine Pgp est majoritairement présente au niveau des cellules endothéliales et aussi sur les astrocytes. Plusieurs fonctions sont attribuées à ce transporteur (Demeule, M., *et al. - 2002*) :

- L'efflux de médicaments permettant de prévenir leur accumulation dans le cerveau
- L'excrétion et la sécrétion de substances neuro-actives du cerveau vers le sang
- Le transport des lipides pour le maintien de la membrane cellulaire
- La séquestration intracellulaire de drogues dans des vésicules de Pgp (Shapiro, A. B., *et al. - 1998*)

C.2.2 Autres transporteurs impliqués dans la pharmacorésistance

C.2.2.1 « Multidrug resistance protein » ou MRP

Les données sur les autres transporteurs de la famille ABC au niveau de la BHE sont plus limitées que celles concernant Pgp.

Les MRPs font partie de la famille ABCC dont le premier membre identifié est MRP1 (1992). Depuis on compte 9 membres des MRP, dans de nombreux tissus, localisés à la membrane apicale pour MRP2 et 4 et à la membrane basale pour MRP1-3-5. Dans le cerveau, ils sont localisés dans les cellules endothéliales (MRP1-6), les astrocytes (MRP1, 3, 4, 5,6) et les neurones (MPR1 et 5) (Loscher, W., *et al. - 2005*).

MRP1,2,3 et 6 contiennent 3 domaines transmembranaires et 2 domaines de liaison à l'ATP alors que MRP 4 et 5 possèdent la même structure de base que MDR1(Loscher, W., *et al. - 2005*) (Figure 19).

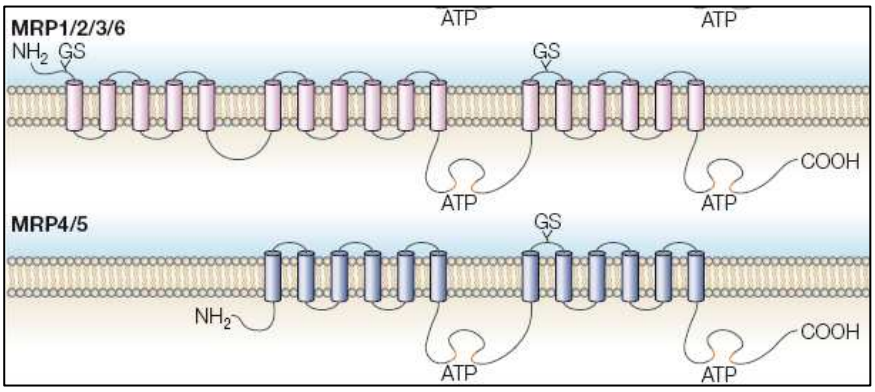


***Figure 19** : Structure des MRPs*

D'après (Loscher, W. - 2005)

C.2.2.2 « Breast Cancer Related Protein » ou BCRP

Bien que BCRP ait été identifié pour la première fois dans des lignées cellulaires de cancer du sein, il n'y a aucune évidence que son expression soit limitée à ces cellules, ni qu'il joue un rôle

significatif dans la résistance aux chimiothérapies de ce cancer. BCRP possède le même spectre de localisation que Pgp suggérant un rôle dans la détoxification des tissus.
Au niveau du cerveau, BCRP est exprimé aussi fortement que MDR1 et MRP1 à la BHE et plus particulièrement par les cellules endothéliales.
Ce transporteur ne possède qu'un seul domaine transmembranaire et de liaison à l'ATP (Loscher, W., *et al. - 2005*).

C.2.3 Transporteurs et pharmacorésistance dans l'épilepsie

Tishler fut le premier à montrer une augmentation du gène MDR1 chez les patients atteints d'épilepsies partielles pharmacorésistantes, plus particulièrement l'épilepsie du lobe temporal. En 1991, W. Löscher rapporta une surexpression de MDR1 dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal réfractaire aux anti-épileptiques (AEDs). Ce transporteur est surexprimé par les cellules endothéliales et les astrocytes et même par les neurones. Par la suite il fut montré que plusieurs MRPs (1, 2 et 5) sont aussi surexprimés chez les patients. De nombreux anti-épileptiques (AEDs) comme le topiramate, phénytoine ou encore le phenobarbital sont des substrats de ces transporteurs (Hoffmann, K., *et al. - 2006,* Hoffmann, K., *et al. - 2007,* Kubota, H., *et al. - 2006*).

INTRODUCTION

CHAPITRE II

ANGIOGENESE

En 1508 Leonardo Da Vinci décrivit pour la première fois le système cardiovasculaire. Il suggéra que le réseau vasculaire se développait comme un arbre à partir d'une graine: le cœur, par l'intermédiaire de ses racines: le système capillaire du foie, avec un tronc principal: l'aorte et des branches essentielles: les artères. Son étude aborda la notion d'arbre vasculaire (Figure 20).

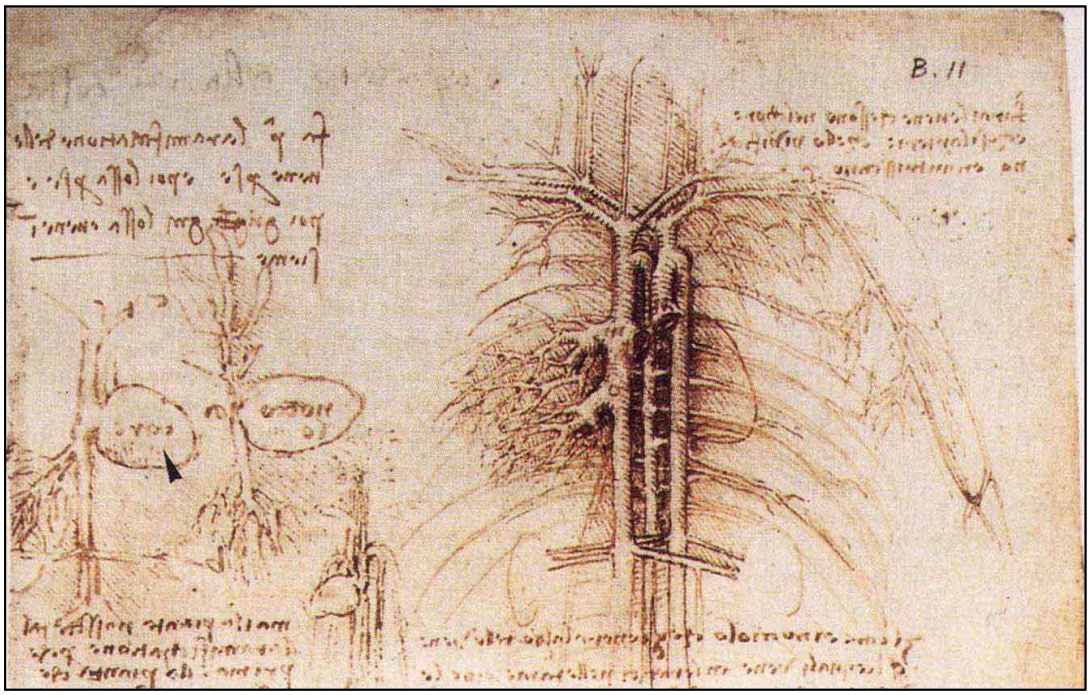


***Figure 20**: Analogie entre la botanique et l'arbre vasculaire par Leonardo Da Vinci*
(The anatomy of man : the cardiovascular system 1508)

Trois cents ans plus tard, Virchow montra la présence d'une vascularisation dans les tumeurs. Puis, en 1971, Judah Folkman fut le premier à démontrer que les tumeurs cancéreuses ne pouvaient se développer qu'en présence d'un réseau de vaisseaux sanguins capables de les « nourrir » mais aussi d'évacuer leurs déchets. Il comprit que la néo-vascularisation des tumeurs était une nouvelle cible thérapeutique. Cette constatation fut la découverte majeure de l'angiogenèse. En 1980, le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) fut identifié. L'angiogenèse est de plus en plus étudiée dans de nombreuses spécialités. (Risau, W. - *1997*). Des traitements anti-angiogéniques sont développés majoritairement en oncologie, depuis la mise sur le marché d'un anticorps monoclonal neutralisant le VEGF (*bevacizumab*) par Les Laboratoires Roche en 2004.

A. Formation des vaisseaux sanguins

A.1 Définitions

Lors de la formation d'un vaisseau sanguin trois mécanismes distincts interviennent : La vasculogenèse, l'angiogenèse et l'artériogenèse (Harrigan, M. R. - *2003,* Risau, W. - *1997*).

La **vasculogenèse** correspond à la formation d'un nouveau vaisseau sanguin à partir de cellules progénitrices : les angioblastes, qui dérivent des hémangioblastes. Ces cellules migrent jusqu'au site de vascularisation où elles se différencient en cellules endothéliales puis fusionnent pour former le plexus capillaire primitif (Figure 21).

Par la suite, un grand nombre de cellules endothéliales sont générées, formant alors de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants. Ce phénomène appelé **angiogenèse** est retrouvé dans l'embryogénèse tardive mais aussi après la naissance et chez l'adulte. L'angiogenèse se fait soit par bourgeonnement (« sprouting »), où les cellules endothéliales des vaisseaux « parents » libérées par la dégradation de la membrane basale forment le nouveau capillaire, soit par « splitting » aussi appelé angiogenèse intussuceptive, où le mur capillaire s'étend dans le lumen, provoquant une scission du vaisseau en deux (Figure 21).

L'**artériogenèse** correspond à l'élargissement d'une artériole préexistante en artère plus large qui permet de rediriger le débit sanguin vers les zones à forte demande. A l'inverse de l'angiogenèse qui fait intervenir un grand nombre de facteurs angiogéniques, l'artériogenèse est initiée par l'augmentation des forces de cisaillement sur le mur vasculaire et dépend de médiateurs inflammatoires.

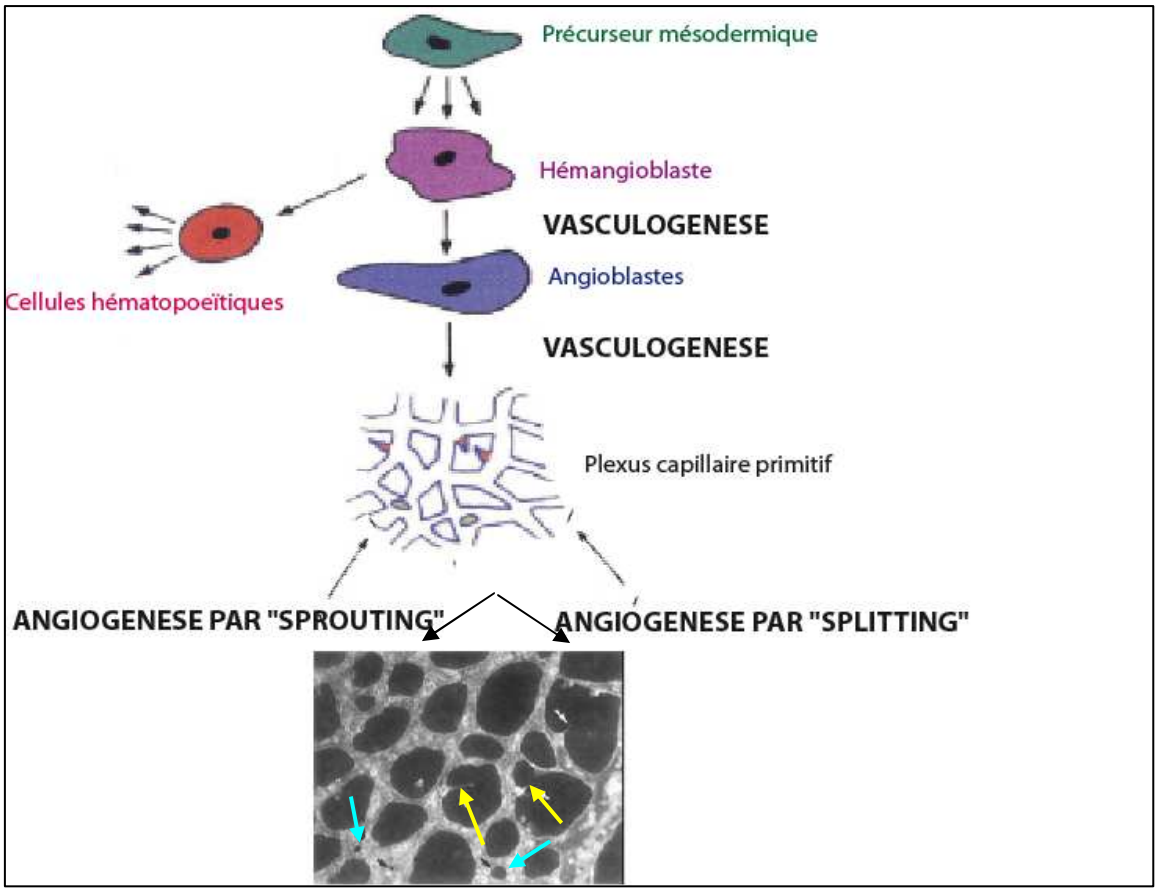


Figure 21*: Vasculogenèse et Angiogenèse. Les flèches jaunes indiquent les vaisseaux nés par sprouting et les flèches bleues l'angiogenèse par splitting.*

(Risau, W. - 1997)

A.2 Etapes de l'angiogenèse

L'angiogenèse intussuceptive participe essentiellement à la formation du foie. Dans les autres organes notamment le cerveau, elle est très peu représentée, l'angiogenèse par bourgeonnement étant le mode prédominant de formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Burri, P. H., *et al.* - *2002*). Elle se déroule en trois grandes étapes : déstabilisation de la paroi du vaisseau préexistant, formation du tube et enfin maturation du vaisseau (Karamysheva, A. F. - *2008,* Patan, S. - *2000*).

- Suite à un stimulus angiogénique, hypoxie ou inflammation, des enzymes de type collagénases ou MMP (*matrix metalloproteases*) sont activées et dégradent la membrane basale et la matrice extracellulaire locales. Le vaisseau est alors déstabilisé (Figure 22; 1-3).
- Les cellules endothéliales du vaisseau « parent » migrent et prolifèrent par mitose vers le stimulus angiogénique et forment un bourgeon vasculaire. Puis les cellules s'alignent et les

bourgeons individuels sont reliés par une boucle qui forme le nouveau capillaire. Cette étape initie le débit sanguin (Figure 22 ; 4-7)

- Une fois le capillaire formé, les processus de maturation débutent avec la formation des jonctions entre les cellules et le recouvrement par des cellules musculaires lisses et des péricytes. Le vaisseau est alors stable et mature (Figure 22 ; 8).

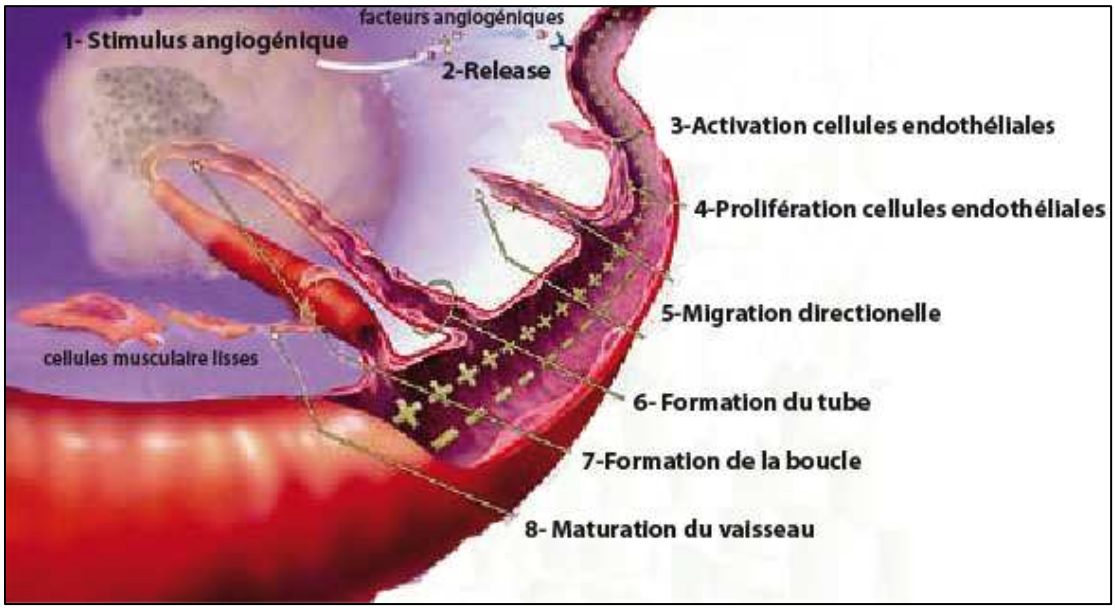


***Figure 22**: Etapes de l'angiogenèse.*

D'après l' « angiogenesis fundation »

Chacune des étapes est régulée par un grand nombre de facteurs angiogéniques ayant des propriétés activatrices ou inhibitrices.

B. Les facteurs angiogéniques

B.1 Le système VEGF/VEGF récepteur

En 1927, Lewis émit l'hypothèse du rôle de l'environnement dans la croissance vasculaire. Puis, Isaac Mickaelson mit en évidence un facteur diffusible en étudiant la vascularisation dans les rétinopathies. Il l'appela le « facteur X ». Il fallut attendre 1968 pour qu'une première expérience démontre la présence de facteurs diffusibles dans les tumeurs et les années 70 pour l'identification des facteurs angiogéniques par Judah Folkman. En 1983 Donald Senger identifia le « vascular permeability factor » ou VPF. En 1989, Napoleone Ferrara et son équipe baptisèrent un facteur endothélial mitogène le « vascular endothelial growth factor » ou VEGF. Son clonage, la même année, permit d'identifier le VEGF comme étant le VPF (Ferrara, N. - *2002*).

Le VEGF est actuellement la cible thérapeutique majeure en cancérologie et ophtalmologie (Bikfalvi, A. - *2006*).

B.1.1 Régulation transcriptionnelle du VEGF

L'induction de VEGF est au croisement d'un grand nombre de voies de signalisation en lien avec l'hypoxie, mais aussi des facteurs de croissance comme l'EGF *(epidermal growth factor)*, TGF-α ou β *(transforming growth factor)*, IGF-1, FGF *(fibroblast growth factor)* ou PDGF *(platelet-deriverd growth factor)* ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou l'IL-1. Malgré la particularité du promoteur de VEGF qui ne possède aucune séquence TATA box, il présente un grand nombre de sites pour différents facteurs de transcription régulés par divers signaux (Figure 23). Le rôle de HIF-1 (*Hypoxia Inductible Factor*), Sp1 et du complexe AP *(activator protein complex)* a été clairement démontré dans la régulation transcriptionnelle du VEGF (Josko, J., *et al. - 2004,* Pages, G., et al. - *2005*).

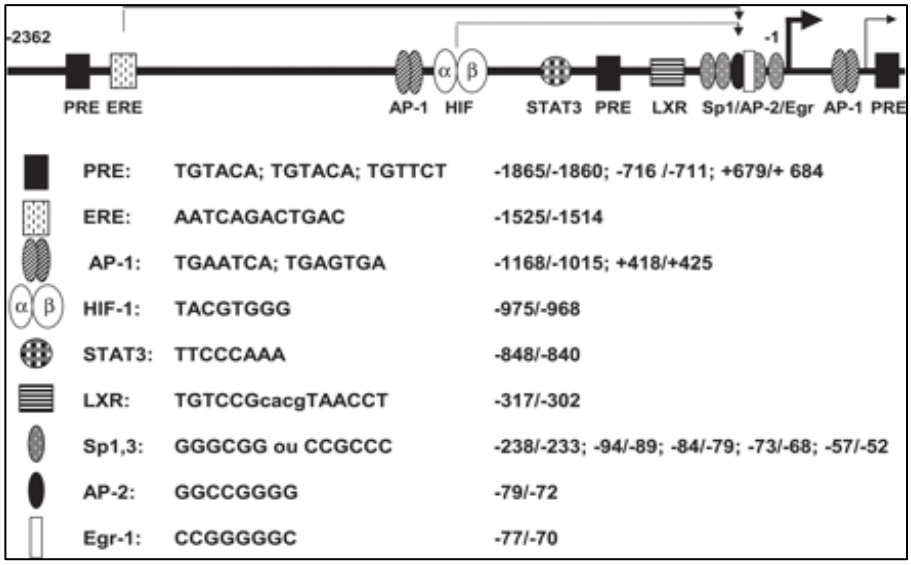


***Figure 23**: Promoteur du VEGF.*

(Pages, G., *et al. - 2005*)

B.1.1.1 Facteur induit par l'hypoxie : HIF-1

Le facteur HIF-1, le plus connu actuellement dans la régulation du VEGF, a été découvert par Georges Semenza en 1992 (Semenza, G. L., *et al. - 1992*). HIF-1 est aussi impliqué dans la

régulation des gènes du métabolisme du glucose, de l'érythropoïèse, du transport du fer ou encore dans la prolifération cellulaire.

Il est composé de 2 sous-unités : l'une, HIF-1α a une expression inductible : et l'autre, HIF-1β constitutive. La régulation de HIF-1 se fait essentiellement par la sous-unité α. En effet, en normoxie la sous-unité α est hydroxylée par des PHD (*prolyl-hydroxylases*). La protéine pVHL (*von Hippel Lindau protein*) est alors fixée à la sous-unité α et reconnue par la ligase E3-ubiquine qui agit sur la partie C terminale, entrainant une dégradation rapide de HIF-α par le protéasome (Huang, L. E., *et al. - 1998*). Par ailleurs, pVHL forme un complexe ternaire avec le co-répresseur FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*) inhibant l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Mahon, P. C., *et al. - 2001*). En hypoxie, HIF-α n'est plus hydroxylé et se dimérise avec HIF-1β dans le cytosol. L'héterodimère est ensuite transloqué dans le noyau où il interagit avec des co-activateurs comme CBP/P300, se fixe à la séquence HRE présente notamment en 5' du promoteur de VEGF-A et en induit la transcription (Pages, G., et al. - *2005,* Semenza, G. - *2002*) (Figure 24). L'expression de la protéine HIF-1α est augmentée par des facteurs comme l'IGF-1, l'EGF ou l'IL-1β. La fixation de ces ligands sur leurs récepteurs tyrosine kinase induit un grand nombre de voies de signalisation dont PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) MAPkinase ou Akt. Ces signaux induisent la phosphorylation de HIF-1α par les ERKs (*Extracellular signal-regulated kinases*) et la voie P38 MAPkinases. L'activation du facteur de transcription est ainsi complète (Richard, D. E., *et al. - 1999,* Semenza, G. - *2002*).

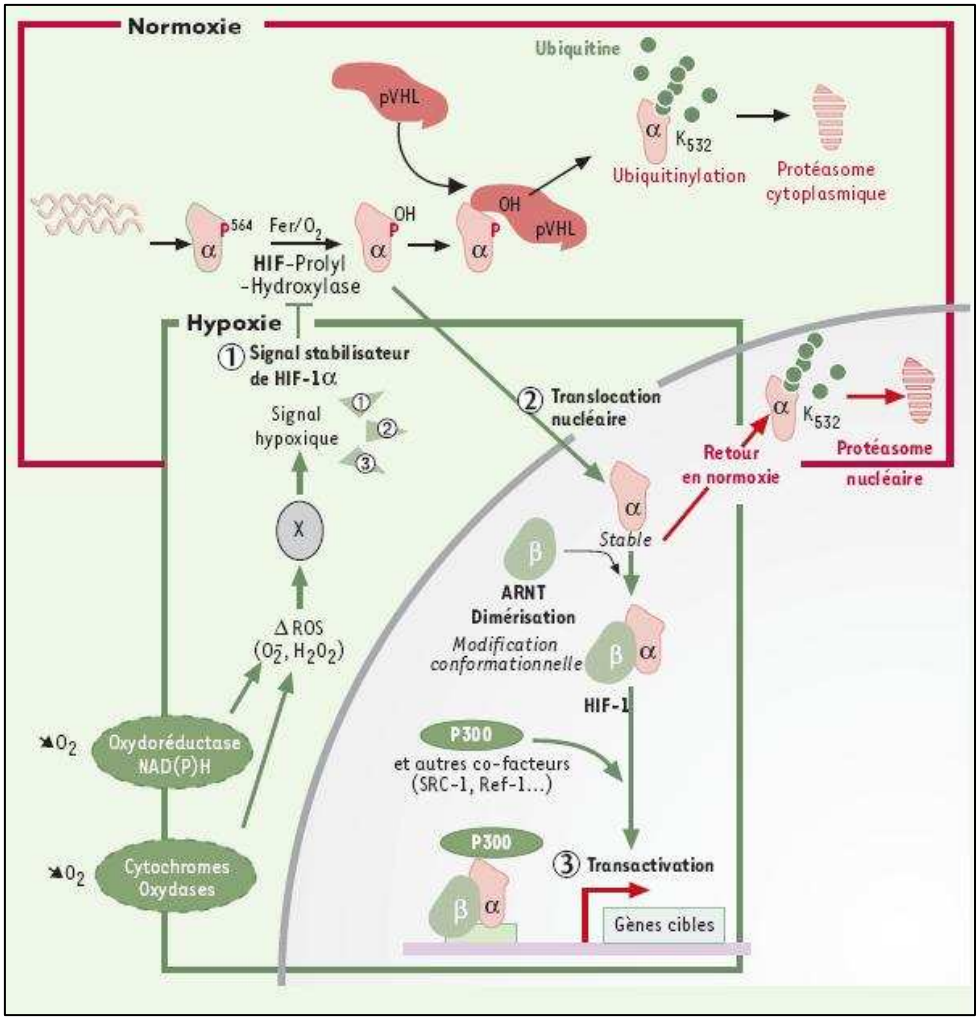


Figure 24: *Régulation de l'activité de HIF-1.*
D'après (Gothie E.,-2002)

B.1.1.2 Sp1

Un deuxième facteur bien connu dans la régulation transcriptionnelle de VEGF est Sp-1, facteur de transcription cloné en 1987 par Robert Tjian. Sp1 fait partie d'une famille multigénique comprenant aussi Sp2, Sp3, Sp4, the « Krüppel-like factor » (XKLFs) et « TGF-β Inducible Early Gene » (TIEGs). Sp1 régule un grand nombre de gènes dont le VEGF, par des interactions protéines/protéines ou par des modifications post-traductionnelles (Kadonaga, J. T., *et al. - 1987,* Suske, G. - *1999*).

Une des protéines interagissant avec Sp1 est la E3 ligase pVHL, un suppresseur tumoral, qui inhibe son activité et donc la transcription du VEGF (Mukhopadhyay, D., *et al. - 1997*). A l'inverse, p53 peut, de la même façon, se fixer sur Sp1 et déjouer la liaison du pVHL, donc lever l'inhibition de la transcription (Zhang, L., *et al. - 2000*). Un autre mode intéressant de régulation

par interactions protéiques est le complexe Sp1/Sp3. En effet Sp3 possède plusieurs isoformes qui agissent soit en répresseurs soit en activateurs de la transcription. En formant un complexe avec Sp1 il agit comme un répresseur. Il a été montré qu'en hypoxie la quantité de Sp3 diminue, permettant à Sp1 d'activer la transcription de VEGF (Discher, D. J., *et al. - 1998*).

Dans la régulation positive ou négative de la transcription, on retrouve une modification post-traductionnelle indispensable : la phosphorylation de Sp1 au niveau des résidus sérine et thréonine. Cette phosphorylation est induite par ERK, suite à son activation par les facteurs de croissance tels que l'EGF ou le TGF-β (Milanini-Mongiat, J., *et al. - 2002*).

D'autre part, Sp1 pourrait être activé par des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1β, l'interféron ou le TNF-α via les MAP kinases (Pages, G., et al. - *2005*).

B.1.1.3 Facteur de transcription AP1

L' « activator protein 1 » ou AP-1 constitue une variété de dimères composés de protéines appartenant aux familles FOS, JUN, ATF (*Activating Transcription Factor*) et JDP (*Jun Dimerization Protein*).

Les protéines JUN peuvent à la fois s'homo- ou s'hétérodimériser, à l'inverse des protéines FOS qui s'hétérodimérisent seulement. AP-1 est impliqué dans un grand nombre de processus biologiques incluant la différentiation cellulaire, la prolifération, l'apoptose et les transformations oncogéniques.

L'activité du complexe AP-1 est régulée par des cytokines, des facteurs de croissance et des signaux de stress. Lorsque ces différents facteurs se lient à leurs récepteurs ils induisent l'activation des JNKs (*Jun N-terminal kinase*), membres de la famille des MAPK. JNK, une fois transloqué dans le noyau, phosphoryle les protéines JUN au niveau des sérines présentes dans le domaine N terminal de transactivation. Les candidats pour la phosphorylation de FOS ne sont pas encore bien identifiés. Une fois activé et dimérisé le complexe AP-1 se fixe à l'ADN au niveau des séquences TRE (*TPA-responsive elements*) (Hess, J., *et al. - 2004,* Jochum, W., *et al. - 2001*).

On trouve un deuxième complexe activator protein ou AP-2. Ce complexe induit l'expression de VEGF, suite à une activation via le TGF-α, HGF et EGF. Il faut noter que malgré son rôle d'activateur de la transcription de VEGF, AP-2 inhibe aussi son expression par une compétition avec Sp3 pour la liaison à son site de fixation (Pages, G., et al. - *2005*).

B.1.1.4 Autres facteurs de transcription

Le promoteur de VEGF est aussi régulé par les hormones femelles. En effet les récepteurs aux œstrogènes (ER α, β) peuvent se lier sur l'ADN au niveau des séquences ERE (*estrogene response element*), mais l'induction de VEGF est différente d'un type cellulaire à un autre. De plus, il a été montré qu'ER α est capable de se lier avec Sp1 ou Sp3, permettant aux œstrogènes de réguler VEGF sans liaison à l'ADN. La progestérone possède aussi un rôle dans la transcription du VEGF à travers les PRA,B (*progesterone receptor A ou B*) qui se fixent au niveau des sites PRE (*progesterone receptor element*), au nombre de 3 sur le promoteur du VEGF.
Il a aussi été identifié sur le promoteur de VEGF un site de fixation pour STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription)*. Ce dernier fait partie de la famille des facteurs de transcription cytoplasmiques STAT, transloqué dans le noyau sous l'effet de cytokines, facteurs de croissance ou hormones (Pages, G., et al. - *2005*).

B.1.2 La protéine VEGF

B.1.2.1 Famille du VEGF

La famille du VEGF est une sous-famille de facteurs de croissance et plus spécifiquement de la famille PDGF. Elle contient 7 membres : VEGF-A, B, C, D, E, PIGF (*placenta growth factor*) et le sv.VEGF (*snake venom VEGF*). A l'exception du VEGF-E et du sv.VEGF, tous sont codés dans le génome des mammifères et possèdent des rôles bien distincts (Shibuya, M. - *2008*).
Le VEGF-E est codé par le virus ORF touchant les chèvres et les moutons. Le VEGF-E est indispensable pour la croissance et la survie du virus, car il stimule la prolifération des vaisseaux sanguins au niveau du site d'infection.
Le svVEGF est retrouvé dans le venin de nombreux serpents, notamment les Viperidae (vipères et crotales). Il est responsable de la perméabilité des vaisseaux observée après empoisonnement (Shibuya, M. - *2008*).
Le VEGF-C et VEGF-D sont structurellement et fonctionnellement similaires. Dans un premier temps, synthétisés sous une forme immature, ils subissent une digestion qui génère des formes plus courtes impliquées dans la régulation de la lymphogenèse (Mccoll, B. K.*, et al. - 2007*). Le gène VEGF-C est exprimé très tôt dans le développement embryonnaire et ont un rôle crucial dans la mise en place du réseau lymphatique. Chez l'adulte, VEGF-C participerait à la maintenance des vaisseaux lymphatiques. Les rôles de VEGF-D sont moins connus mais son patron d'expression chez la souris indique un rôle important dans le développement pulmonaire.

On retrouve VEGF-C et D dans le cœur, le foie, les cellules mésenchymateuses et pour le VEGF-D, aussi dans le colon et l'intestin grêle (Shibuya, M. - *2008*).
Le VEGF-B et le PIGF exercent une activité angiogénique pendant de la vasculogenèse et l'angiogenèse embryonnaires. L'expression de PIGF est réduite au placenta où l'épissage alternatif génère 3 isoformes : PIGF-1, PIGF-2 et PIGF-3. VEGF-B, au contraire de PIGF qui a une distribution tissulaire large et qui est particulièrement abondant dans les muscles cardiaques et squelettiques. Deux isoformes existent VEGF-B167 et VEGF-B186 (Shibuya, M. - *2008*).

Le VEGF-A est exprimé de façon ubiquitaire. Son pouvoir angiogénique est 10 fois plus important que ceux du VEGF-B ou du PIGF. C'est pour cette raison que le VEGFA et ses différentes fonctions sont les plus étudiés dans l'angiogenèse (Olsson, A. K., et al. - *2006,* Shibuya, M. - *2008*).

B.1.2.2 Isoformes du VEGF-A

Le gène du VEGF humain est localisé sur le chromosome 6 et organisé en 8 exons séparés par 7 introns (Figure 25). En 1989, la première isoforme du VEGF ($VEGF_{165}$) a été découverte par Napoleone Ferrara. Depuis cette année et jusqu'à 2003, six autres formes ont été identifiées: $VEGF_{121}$ - $VEGF_{145}$ - $VEGF_{162}$ - $VEGF_{183}$ - $VEGF_{189}$ – $VEGF_{206}$ (Harper, S. J., *et al. - 2008*).
Chez la souris, le gène du VEGF est localisé sur le chromosome 17 et chez le rat sur le chromosome 9. Différentes isoformes équivalentes aux humaines, sont retrouvées chez ces espèces.

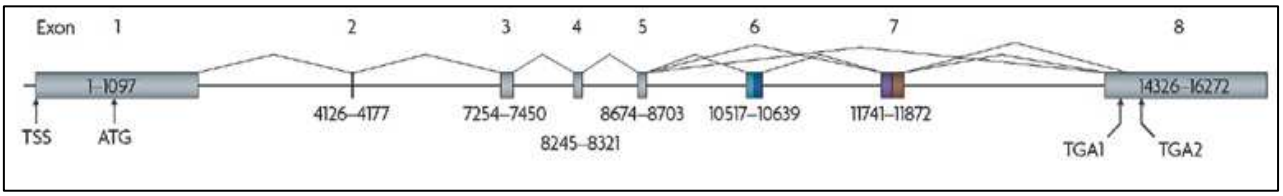


Figure 25: *Gène humain du VEGF-A. D'après (Harper, S. J., et al. - 2008)*

Ces isoformes proviennent d'un épissage alternatif des exons 6 et 7 responsables de l'affinité et de la liaison aux héparines. La présence ou l'absence de ces exons confèrent différentes caractéristiques et biodisponibilités aux isoformes (Table 4).

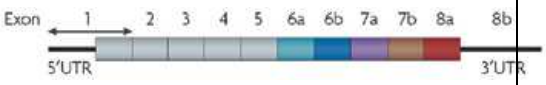
Isoforme	Liaison héparine	Ancrage membrane	Distribution tissulaire
$VEGF_{206}$ 	Présente Forte affinité	Oui	Rare, limité placenta
$VEGF_{189}$	Présente Forte affinité	Oui	Tous types cellulaires
$VEGF_{183}$	Présente Forte affinité	Oui	Tous types cellulaires
$VEGF_{165}$	Présente Affinité modérée	Oui mais aussi sécrété	Tous types cellulaires
$VEGF_{145}$	Affinité modérée mais pas de liaison	Oui par l'exon 6a qui permet l'ancrage indépendamment de l'héparine	Rare, limité placenta
$VEGF_{121}$	Non	Non, forme totalement sécrété	Tous types cellulaires

Table 4 : Isoformes du VEGF

Il faut noter que des variants $VEGF_{148}$ et $VEGF_{162}$ ont été identifiés. Lié à l'héparine, le VEGF est ancrée à la matrice extracellulaire (ECM) dans un stock, puis il est libéré sous une forme diffusible par clivage soit par des plasmines au niveau de l'extrémité C terminale, soit par des héparinases coupant au niveau des domaines héparine-like. Ce clivage conduit à un fragment bioactif contenant les 110 premiers acides aminés de l'extrémité NH2 : $VEGF_{110.}$ (Figure 26).
Ce mécanisme est très important pour la régulation locale de l'activité du VEGF (Ferrara, N. - *2004*).

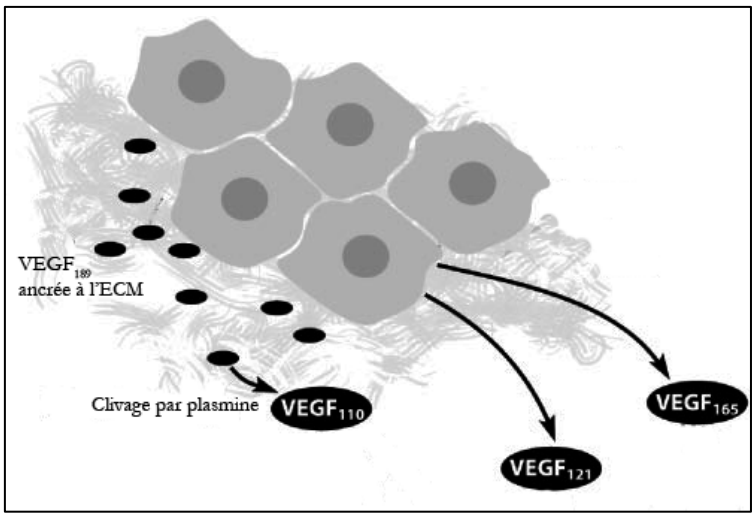


***Figure 26**: Isoformes du VEGF. Les formes diffusibles $VEGF_{165}$ et $_{121}$ sont libérées par la plupart des cellules.*
La plasmine clive au niveau C-ter le $VEGF_{189}$ et libère une forme diffusible $VEGF_{110}$.
D'après (Ferrara, N. - *2002*)

En 2002 une « famille sœur » des isoformes ayant 94 à 98% d'homologie a été découverte : $VEGF_{xxxb}$. Un épissage au niveau de l'exon 8 a été retrouvé, montrant des propriétés bien différentes. En effet une étude démontre une propriété anti-angiogénique du $VEGF_{165b}$ à l'inverse de l'isoforme $VEGF_{165a}$ (Ladomery, M. R.*, et al. - 2007*).

B.1.3 Récepteurs du VEGF : structure, activation et rôle

B.1.3.1 Structure des récepteurs

Les membres de la famille du VEGF agissent sur trois récepteurs tyrosine kinase spécifiques: VEGFR-1; VEGFR-2 et VEGFR-3. Ces récepteurs ont des analogies de séquences et de structures. La partie extracellulaire contient 7 domaines IgG-like ayant chacun un rôle bien précis dans l'activation des récepteurs par leurs ligands :

- Le premier pourrait être impliqué dans la régulation de la liaison du ligand
- Les domaines 2 et 3 sont nécessaires pour la fixation du ligand
- Le domaine 4 est important pour la dimérisation des récepteurs
- Les domaines 5 et 6 permettent la rétention du VEGF après sa fixation

Les récepteurs possèdent un domaine transmembranaire ainsi qu'une partie intracellulaire composée de deux domaines tyrosine kinase.
Chacun de ces récepteurs a un rôle différent, selon sa distribution tissulaire et ses ligands (Ferrara, N. - *2004,* Ferrara, N.*, et al. - 2003*).

Le VEGFR-1 a été le premier récepteur tyrosine kinase identifié. Il est aussi connu sous le nom de Flt-1 (*fms-like-tyrosine kinase*) (De Vries, C.*, et al. - 1992*). Le gène de ce récepteur est régulé par

l'hypoxie via HIF-1 qui possède un site consensus sur le promoteur (Gerber, H. P., *et al.* - *1997*). Il s'agit d'une glycoprotéine de 180 kD exprimée dans les cellules vasculaires quiescentes, les cellules hématopoïétiques, les monocytes et les macrophages. Les souris VEGFR-1 -/- meurent au stade embryonnaire E8.5 par désorganisation du réseau vasculaire, soulignant le rôle de ce récepteur dans la vasculogenèse VEGFR-1 a pour ligands VEGF-A mais aussi VEGF-B et PIGF. L'épissage alternatif du gène produit une forme soluble de VEGFR-1 possédant seulement 6 domaines IgG-like (Fong, G. H., *et al.* - *1999*). Cette forme est reconnue par le VEGF, et peut donc inhiber l'activité de VEGF (Figure 27) (Ferrara, N. - *2004,* Ferrara, N., et al. - *2003*).

Le VEGFR-2 est aussi connu sous les noms de KDR (*kinase domain region*) chez l'homme ou Flk-1 (fetal liver kinase-1) chez la souris. VEGFR-2 est aussi régulé par l'hypoxie, mais de façon indépendante de HIF-1 (Terman, B. I., *et al.* - *1992*). En effet, ce sont les facteurs libérés dans la zone ischémique comme le VEGF ou encore le bFGF qui sur-régulent VEGFR-2. Ce récepteur est une glycoprotéine de 200 à 230 kD exprimée essentiellement sur les cellules vasculaires et les neurones. Les souris VEGFR-2 -/- meurent au stade embryonnaire E9.5 par défaut du développement des cellules endothéliales et hématopoïétiques (Shalaby, F., *et al.* - *1995*). VEGF-A ainsi que VEGF-C et D sont des ligands de VEGFR-2. Notons que le VEGF-E, forme virale du VEGF se lie aussi à ce récepteur (Figure 27) (Ferrara, N. - *2004,* Ferrara, N., et al. - *2003*).

Le dernier récepteur de VEGF découvert est le VEGFR-3 ou Flt-4. A la différence des deux autres récepteurs, il est synthétisé sous forme d'un précurseur contenant 7 domaines IgG-like. Après clivage protéolytique au niveau du domaine 5, ce dernier est remplacé par un pont disulfure reliant 2 chaines, une de 125 kD et une de 75 kD (Cebe-Suarez, S., *et al.* - *2006*). Chez l'adulte, VEGFR-3 est décrit au niveau des vaisseaux lymphatiques, où il joue un rôle important dans la lymphogenèse. On le retrouve aussi dans les cellules vasculaires, monocytes et macrophages. VEGFR-3 est activé à la fois par VEGF-C et D (Figure 27).

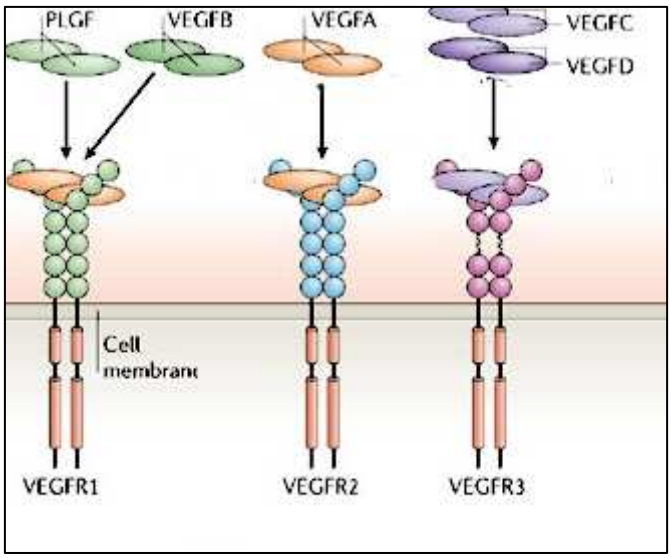


***Figure 27**: Récepteur-tyrosine kinase du VEGF*
D'après (Olsson, A. K., et al. - 2006)

B.1.3.2 Co-récepteurs

La signalisation du VEGF est très complexe. En effet VEGF et aussi ses récepteurs interagissent avec d'autres protéines comme les neuropilines, l'héparine, les intégrines et les cadhérines. Ces différentes interactions permettent de la coordination au niveau de la force, du décours et de la spécificité du signal (Cebe-Suarez, S., et al. - *2006*).

Les neuropilines 1 et 2 (NRP1-2) sont des glycoprotéines transmembranaires possédant une large partie extracellulaire composée de plusieurs domaines de liaison et une queue cytoplasmique très courte contenant un domaine PDZ (Pellet-Many, C., *et al. - 2008*). Elles ont tout d'abord été identifiées comme des protéines de guidance axonale au cours du développement (Neufeld, G., *et al. - 2002*). Par la suite, il a été montré que les membres de la famille VEGF sont aussi des ligands de NRP. NRP1 lie à la fois VEGF-A, B ainsi que PIGF-2 alors que NRP2 lie VEGFA, C et D. Les souris NRP1-/- meurent au stade embryonnaire E10.5-12.5, d'anomalies cardiovasculaires (Kawasaki, T., *et al. - 1999*). En effet NRP1 forme un complexe avec les récepteurs VEGFR-2 qui augmente l'efficacité de la liaison de VEGF-A, procurant ainsi une meilleure activation de VEGFR-2, ce qui améliore la migration et le remodelage vasculaire. La capacité de VEGF-A_{165} à lier NRP1 pourrait expliquer son pouvoir mitogène plus élevé que l'isoforme 121 (Soker, S., *et al. - 1998*). De la même façon, NRP1 peut lier VEGFR-1 mais les rôles de ce complexe sont encore mal définis. Actuellement, on suppose un effet de séquestration du VEGF, limitant ainsi sa fixation sur VEGFR-2 (Fuh, G., *et al. - 2000*) (Figure 28).
NRP2 se lie à la fois à VEGFR-1, 2 et 3. La formation du complexe NRP2/VEGFR-2 provoque une diminution de l'activité du récepteur de VEGF, alors que NRP2/VEGFR3 induit une

activation complète du récepteur. La fonction du complexe NRP2/VEGFR-1 reste non élucidée. (Cebe-Suarez, S., *et al. - 2006,* Ferrara, N. - *2004,* Pellet-Many, C., *et al. - 2008*).

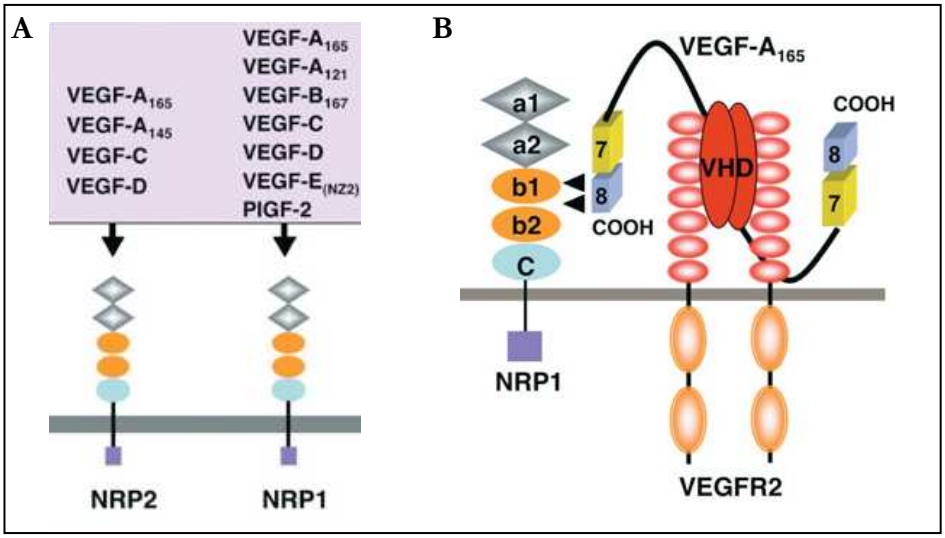


Figure 28:
A. Structure de NRP1 et NRP2 et leurs ligands.
B. Corécepteur du VEGFR-2 via la fixation du VEGF-A
D'après (Pellet-Many, C., et al. - 2008)

Les protéines de la famille des « **héparines sulfates »** sont présentes ubiquitairement à la surface cellulaire ou à la matrice extracellulaire. Elles sont composées d'un centre de 1 à 4 chaines polysaccharidiques, soit transmembranaire par l'ancrage avec les GPI (*glycosylphosphatidylinositol*) soit intégré à la matrice extracellulaire. Les héparines possèdent de nombreux ligands parmi les facteurs de croissance et leurs récepteurs, notamment le VEGF-A et VEGFR-1 et 2. La fixation de l'héparine sur VEGF-A inhibe sa liaison à VEGFR-1 alors qu'elle stimule la fixation sur VEGFR-2. Cependant, même si l'héparine diminue la liaison de VEGF sur VEGFR-1, elle augmente l'activité des kinases. Il a aussi été montré que la forme soluble de VEGFR-1 possède une affinité pour les héparines, qui permet l'ancrage de ce récepteur à la matrice extracellulaire. Le rôle des héparine-sulfate au niveau de la régulation de l'angiogenèse reste encore très complexe, du fait des interactions entre ces diverses molécules et surtout du type de cellules endothéliales impliquées (Matsumoto, T., *et al. - 2001,* Stringer, S. E. - *2006*).

Les **intégrines**, récepteurs majeurs de l'ECM, sont des hétérodimères αβ existant sous différentes conformations en regard de l'affinité pour leurs ligands. Ce sont des molécules impliquées à la fois dans l'adhésion cellulaire et des récepteurs capables de transmettre un signal. Elles jouent un rôle majeur dans l'angiogenèse embryonnaire et post-natale, notamment au niveau de la guidance cellulaire. L'intégrine αvβ3 permet l'adhérence des cellules endothéliales au niveau d'une matrice provisoire lors de l'angiogenèse. Cependant cette intégrine est aussi capable de se lier au VEGFR-2 et de potentialiser la réponse au VEGF-A au niveau des cellules endothéliales. La formation du

complexe VEGFR-2/α2β3 nécessite une activation croisée par la phosphorylation de la partie extracellulaire de l'intégrine par le VEGF présent sur son récepteur. Les intégrines n'ont pas qu'un rôle restreint au niveau de VEGFR-2. En effet l'intégrine α5β1 s'associe de façon sélective au VEGFR-3, permettant une activité optimale du récepteur (Cebe-Suarez, S., *et al. - 2006,* Napione, L., *et al. - 2007*).

L'activation de VEGFR-2 est influencée par l'état d'adhésion des cellules endothéliales régulées par la famille des **cadhérines** notamment. Ces dernières, comme les intégrines, forment des complexes protéiques avec les récepteurs des facteurs croissance et modulent à la fois leur disponibilité et leur activation (Caveda, L., *et al. - 1996*).
La vascular endothelial (VE)-cadhérines est exprimée à la surface des cellules endothéliales et indispensable à la survie cellulaire. La VE-cadhérine induit à la fois une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation des effets anti-apoptotiques. Ces effets complexes pourraient s'expliquer par son interaction avec la déphosphatase-1 (DEP1) qui provoque une déphosphorylation de résidus spécifiques selon les conditions cellulaires (Dejana, E. - *2004*). Sur des cellules confluentes, la VE-cadhérine est clustérisée au niveau des jonctions cellulaires et induit la survie cellulaire par l'activation des voies anti-apoptotiques du VEGFR-2 (PI3k/Akt) (Carmeliet, P., *et al. - 1999*). A l'inverse, sur des cellules dispersées, l'absence de VE-cadhérines active des voies de prolifération cellulaire du VEGFR-2 (PLC-γ) (Takahashi, T., *et al. - 2001*) (Figure 29).

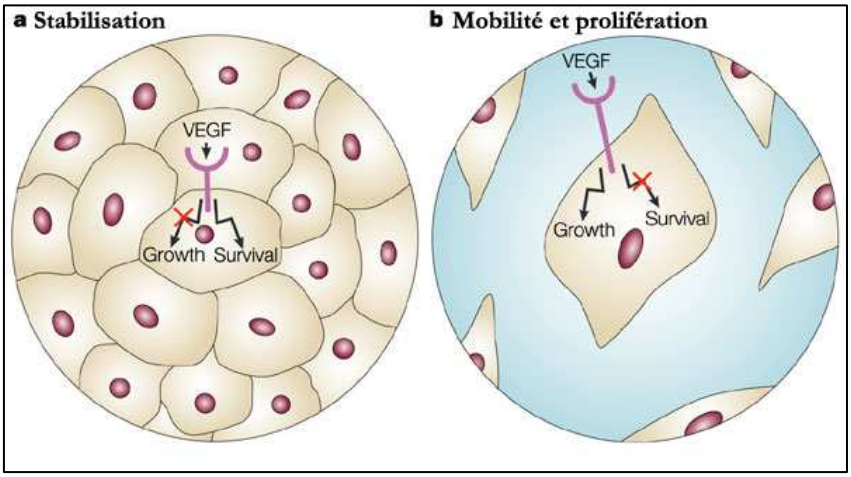


Figure 29:
a. Stabilisation et survie cellulaire en présence de VE-cadhérine b. Prolifération et migration cellulaire en absence de VE-cadhérine
D'après (Dejana E.,- 2004)

Notons que l'effet sur la prolifération cellulaire passe aussi par l'interaction des cadhérines avec la β-caténine. Cette interaction inhibe la translocation dans le noyau de la β-catenine, empêchant l'activation de kinase(s) impliquée(s) dans le cycle cellulaire. Ce phénomène n'est pas exclusif pour la VE-cadhérine. En effet, on le retrouve dans le cas des récepteurs FGFR-1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor)*, EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) *via* la N-cadhérine, retrouvée dans les cellules nerveuses et la E-cadhérine (épithéliale).
De plus, la VE-cadhérine, par son interaction avec VEGFR-2, répond de façon spécifique aux forces de cisaillement en absence de VEGF (Cross, M. J., *et al. - 2003,* Dejana, E. - *2004*).

B.1.3.3 Activation des récepteurs et signalisation

L'activation des voies de signalisation des récepteurs du VEGF nécessite deux grandes étapes : la dimérisation du ligand et la liaison aux récepteurs. VEGF-A, prédominant dans l'angiogenèse, se dimérise au niveau de sites spécifiques qui relient chaque monomère par des ponts disulfures. Chaque monomère est orienté en sens opposé, exposant à chaque extrémité un site de liaison aux récepteurs. VEGF-A possède deux domaines distincts pour l'interaction avec VEGFR-2 ou VEGFR-1. Dans chacun de ces sites, certains acides aminés sont cruciaux pour la liaison aux récepteurs : l'arginine 82, la lysine 84 et l'histidine 86 pour VEGFR-2 et Asp 63, le glutamate 64 et le glutamate 67 pour VEGFR-1. Cet arrangement opposé des sites de liaisons sur le dimère montre la capacité de VEGF à fixer 2 récepteurs formant alors des homodimères ou des hétérodimères. Une fois le VEGF lié, les récepteurs sont activés suivant le schéma classique des récepteurs tyrosine kinase. La dimérisation active les kinases dont les substrats sont des molécules de la transduction du signal (Matsumoto, T., *et al. - 2001,* Neufeld, G., *et al. - 1999*) (Figure 30).

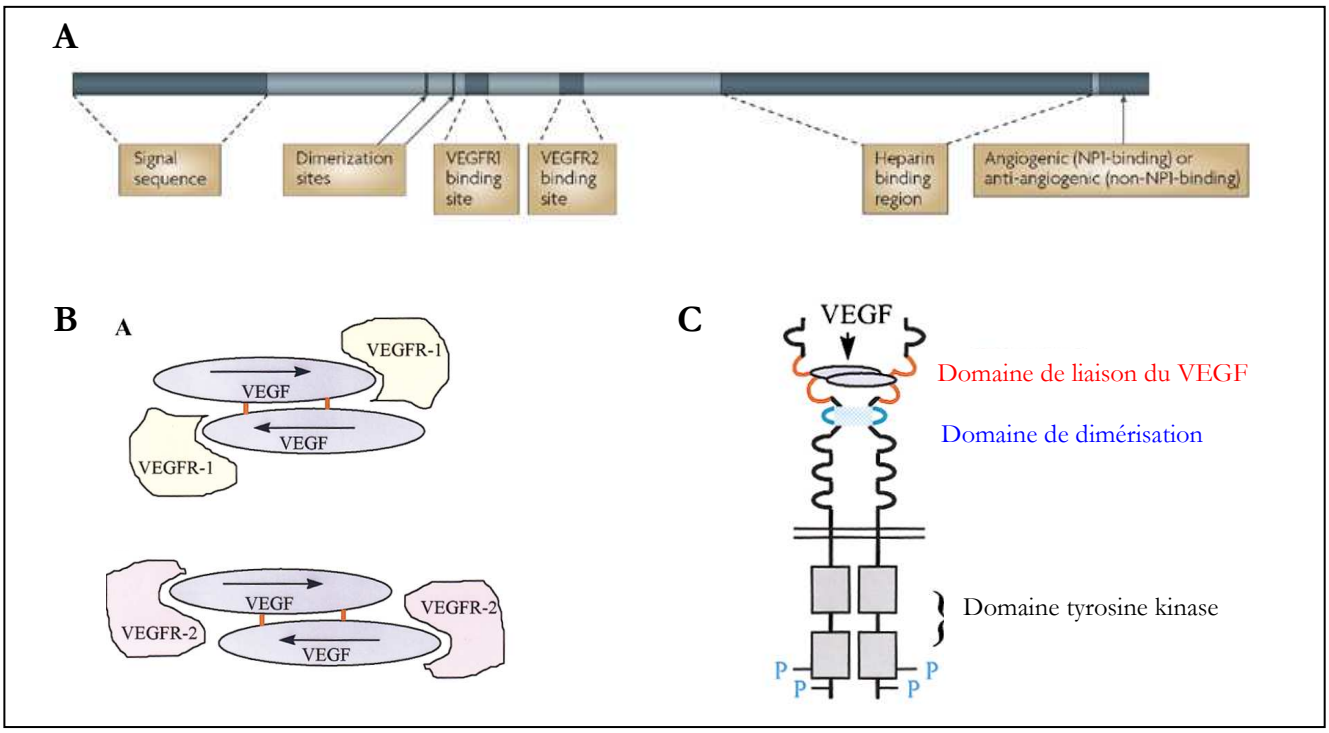


Figure 30:
A. Site de liaison et dimérisation du VEGF-A. D'après (Harper, S. J., et al. - 2008)
B. Dimérisation du VEGF-A et fixation au récepteur
C. Activation du récepteur par phosphorylation au niveau des domaines tyrosine kinase. D'après (Neufeld, G., et al. - 1999)

B.1.3.3.1 Complexe VEGFR-1

VEGFR-1 a une forte affinité pour le VEGF-A. Cependant, son niveau de phosphorylation est faible, par l'absence ou la déficience de l'activité kinase. En effet, il existe différents sites de phosphorylation liant les protéines, avec un ou plusieurs domaines SH2, spécifiques de la liaison aux phosphotyrosines (Ito, N., *et al. - 1998*). Parmi ces protéines, on retrouve la phospholipase C-γ (PLC-γ), SHP-2, PI3K, Grb2 (*growth-factor-receptor-bound 2*) et Nck (Ito, N., *et al. - 2001*). Bien que tous ces sites aient été identifiés, l'aval de la cascade de signalisation et leurs rôles dans la fonction biologique du récepteur restent encore indéterminés.

Les fonctions biologiques de VEGFR-1 sont elles-mêmes très controversées. Dans un premier temps, ce récepteur était considéré comme un régulateur négatif de VEGFR-2 qui piègerait VEGF-A durant l'embryogénèse, régulant ainsi sa disponibilité pendant le développement vasculaire (Hiratsuka, S., *et al. - 1998*). D'autre part, plusieurs groupes ont montré que VEGFR-1 régule négativement les signaux de VEGFR-2 via la voie PI3Kinase. Cependant certains, groupes ont pu identifier un rôle de régulateur positif car la liaison de PIGF sur VEGFR-1 induit une augmentation de la phosphorylation de VEGFR-2 (Carmeliet, P., *et al. - 2001*).

Les effets opposés dans la régulation de VEGFR-2 par VEGFR-1 dépendent de l'environnement biologique. Mais ses effets ne sont pas encore totalement compris (Matsumoto, T., *et al. - 2001,* Olsson, A. K., *et al. - 2006*).

B.1.3.3.2 Complexe VEGFR-2

Les principaux effets biologiques de VEGF-A passent par VEGFR-2. Malgré une affinité moindre pour son ligand, VEGFR-2 active 10 fois plus les kinases que VEGFR-1. La dimérisation du récepteur conduit à une autophosphorylation de résidus tyrosines spécifiques : Tyr^{951}et Tyr^{996}situés entre les domaines kinases, les Tyr^{1054}et Tyr^{1059}présents dans le domaine tyrosine kinase, et les Tyr^{1175}et Tyr^{1214} au niveau de la queue C-terminale. Les résidus Tyr^{1054}, Tyr^{1059} sont indispensables pour une activité maximale du récepteur (Dougher, M., *et al. - 1999*). Un grand nombre de voies de signalisation, incluant PI3K, PLC-γ- famille src, RAS-GTPase-activated protein (RAS-GAP), Nck, FAK, Akt, PKC, Raf-1, Mek, ERK ou encore P38 MAPKinase, sont activés par ces phosphorylations et permettent les différents fonctions biologiques du VEGF-A : prolifération, survie, migration et perméabilité (Cross, M. J., *et al. - 2003,* Holmes, K., *et al. - 2007,* Olsson, A. K., *et al. - 2006*) (Figure 31)

Comme de nombreux récepteurs, VEGFR-2 induit la **prolifération cellulaire** à travers l'activation de la voie Erk qui mène à la transcription de gènes. Pour VEGFR-2, à la différence des autres récepteurs, Erk n'est pas activé par la voie classique Grb2-SOS-Ras mais par une voie-PKC dépendante impliquant l'activation de la PLC-γ. La PLC-γ possède 2 domaines SH2 permettant de se fixer directement sur VEGFR-2 au niveau de la Tyr^{1175}. Une fois phosphorylée elle hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) qui produit de l'inositol 1,4,5 tri-phosphate (IP3) et du diacylglycerol (DAG). L'IP3 induit une augmentation du calcium intracellulaire alors que la DAG active la PKC qui, elle-même, induit l'activation de la voie Erk, notamment les p42/44 MAPkinase (Cross, M. J., *et al. - 2003,* Holmes, K., *et al. - 2007,* Matsumoto, T., *et al. - 2001,* Olsson, A. K., *et al. - 2006*).

La **migration des cellules** endothéliales est un point critique de l'angiogenèse qui dépend des gradients de VEGF et d'autres facteurs. De nombreuses voies de signalisation intracellulaire de VEGFR-2 sont impliquées dans la migration. Shb est une protéine adaptatrice qui lie un grand nombre de protéines comme FAK (*focal adhesion kinase*) une enzyme importante dans l'attachement cellulaire et la migration. Shb est aussi impliquée dans l'activation de la PI3K qui

induit une augmentation du lipide PIP3 Rac, petite protéine liant le GTP, impliquée dans la mobilité cellulaire par régulation du cytosquelette. Au niveau de la Tyr^{1214}, une autre voie est impliquée dans la réorganisation de l'actine : P38 MAPK phosphorylant HSP27 (*heat-shock-protein 27*) (Cross, M. J., *et al. - 2003,* Holmes, K., *et al. - 2007,* Matsumoto, T., *et al. - 2001,* Olsson, A. K., *et al. - 2006*).

La **survie cellulaire** est dépendante de la voie PI3K. La formation de PIP3 déclenche la phosphorylation d' AKt/PKB qui inhibe les voies pro-apoptotiques par phosphorylation directe de BAD (*Bcl-2 associated death promotor*) et caspase 9. De plus, VEGF-A induit l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) ou la survivine qui inhibe les caspases 3 et 7. La survie des cellules endothéliales est influencée par l'ECM, notamment via les intégrines αvβ qui augmentent l'activité d'Akt (Cross, M. J., *et al. - 2003,* Holmes, K., *et al. - 2007,* Matsumoto, T., *et al. - 2001,* Olsson, A. K., *et al. - 2006*). Une étude récente sur l'ischémie montre qu'une privation en oxygène et glucose active la voie ERK via VEGF (Narasimhan, P., *et al. - 2009*).

La **perméabilité vasculaire** nécessite l'activation de la eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) qui permet la production de NO (nitric oxide). La eNOS est activée à la fois par la PLC-γ via une voie dépendante de l'influx de calcium et par la voie AKT/PKB qui phosphoryle directement la eNOS. VEGFR-2 active d'autres molécules intracellulaires impliquées dans la perméabilité comme la protéine src. Cependant la eNOS intervient aussi dans la vasodilatation permettant une meilleure adaptation du flux sanguin (Cross, M. J., *et al. - 2003,* Holmes, K., *et al. - 2007,* Matsumoto, T., *et al. - 2001,* Olsson, A. K., *et al. - 2006*)

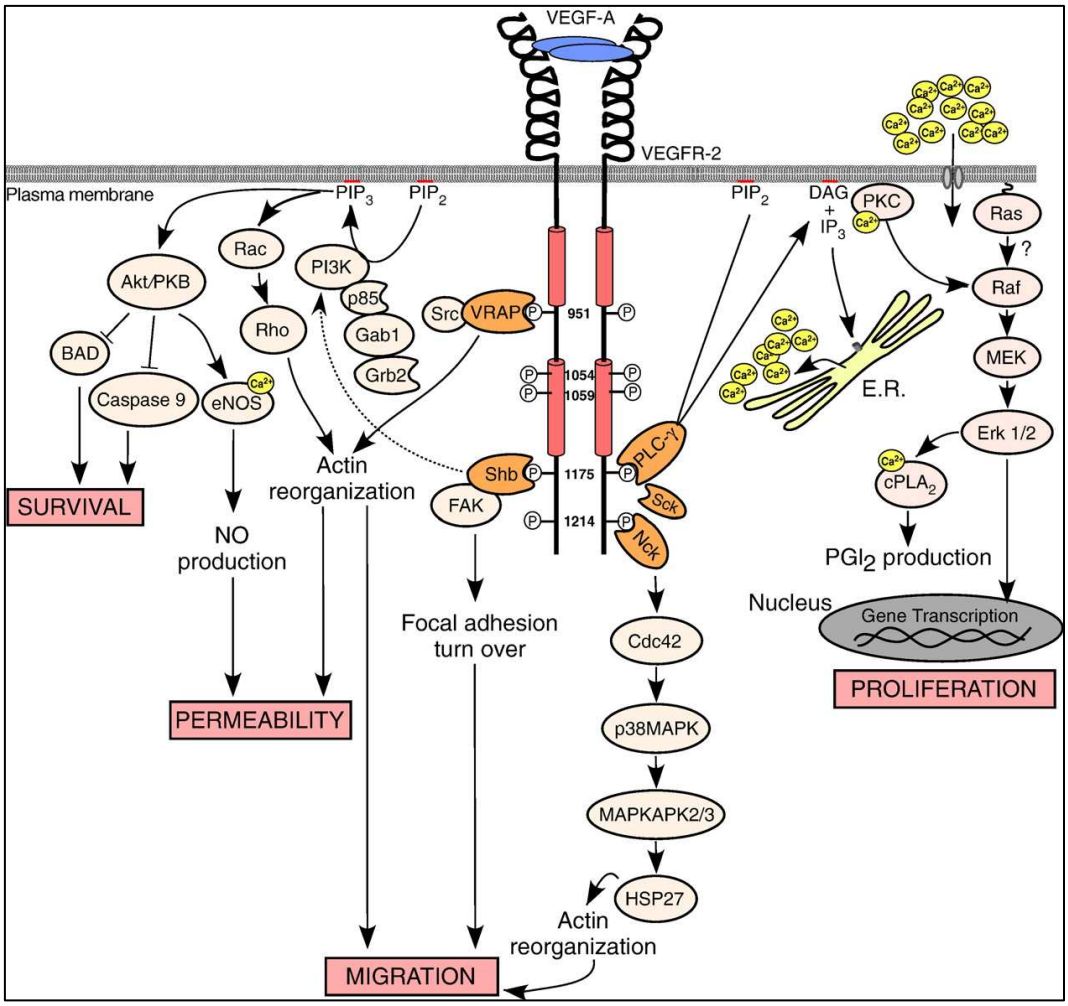


Figure 31: *Voies de signalisation de VEGFR-2 en réponse à l'activation par VEGF-A*
D'après (Holmes, K., *et al.* - 2007)

B.1.3.3.3 Complexe VEGFR-3

L'activation de VEGFR-3 induit la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales lymphatiques. De nombreux sites de phosphorylations sont présents : Tyr 1063, 1068, 1230 ,1231 ,1265 ,1337 et 1363. Les Tyr1063 et Tyr1068 seraient impliqués dans la régulation de l'activité kinase de VEGFR-3. La Tyr1337 est requise pour l'association de Shc-Grb2, cependant les autres signaux de transduction impliquant d'autres sites de phosphorylation restent à déterminer (Pajusola, K., *et al.* - *1994*). Mäkinen a pu démontrer une activation de la voie ERK dépendante de la PKC mais aussi de la voie PI3K/Akt/PKB, importante dans la migration des cellules précurseurs lympho-endothéliales lors du développement embryonnaire via VEGF-C (Makinen, T., *et al.* - *2001*). D'autres voies activées par VEGFR-3 ont été identifiées, notamment la voie STAT-3 ou STAT-5, mais leur rôle dans la fonction biologique des ligands de ce récepteur

reste encore indéterminée. On note aussi la capacité de VEGFR-2 et VEGFR-3 à s'hétérodimériser en réponse au VEGF-C. Ces complexes sont présents sur les cellules endothéliales lymphatiques et sur certaines cellules endothéliales vasculaires notamment au niveau des capillaires fenestrés. Lors de la formation de l'hétérodimère la Tyr 1367, nécessaire à la liaison de Shc-Grb2 est absente, indiquant une possible régulation de VEGFR-3 (Cross, M. J., *et al. - 2003,* Matsumoto, T., *et al. - 2001*).

B.2 Le système Angiopoiétines/Tie

Les angiopoiétines ont été découvertes plus tard que le VEGF, dans les années 1990. Depuis, de nombreuses études tentent de comprendre ce système de régulation très complexe. Les angiopoiétines (Ang) sont avec le VEGF des facteurs spécifiques de la croissance des cellules endothéliales, fonctionnant de façon croisée, voire complémentaires. A ce jour les angiopoiétines sont des cibles thérapeutiques potentielles.

B.2.1 La famille des angiopoiétines

La famille des angiopoiétines comprend 4 membres Ang1, 2, Ang3 chez la souris et Ang4 chez l'homme. Chez la souris, on retrouve les homologues d'Ang1 et Ang2. Cependant Ang3 et Ang4 sont des orthologues inter-espèces qui divergent au niveau de la structure, expliquant leurs rôles et expressions différentes. Les angiopoiétines contiennent un domaine fibrinogen-like à l'extrémité C-ter, un domaine central coiled-coil et une courte terminaison N-ter (Davis, S., *et al. - 1996,* Maisonpierre, P. C., *et al. - 1997,* Valenzuela, D. M., *et al. - 1999*). L'extrémité C-ter est requise pour la liaison sur les récepteurs, le domaine coiled-coil est nécessaire à la formation des dimères Ang et le dernier domaine permet à Ang1 d'exister sous une forme trimérique ou encore pentamérique (Davis, S., *et al. - 2003*). Les angiopoiétines sont des protéines sécrétées par les cellules péri-vasculaires qui agissent sur les cellules endothéliales via leur récepteur (Eklund, L., *et al. - 2006*).

L'**Ang1,** clonée en 1996 par Davis, est une glycoprotéine de 70 kD, retrouvée dans la plupart des tissus chez l'adulte et ancrée dans l'ECM. Comme la plupart des facteurs angiogéniques, l'hypoxie participe à la régulation de l'expression d'Ang1 de façon transitoire. Cependant, on retrouve aussi des facteurs inflammatoires comme le TNF-α ou le VEGF, augmentant la production de la protéine ou encore l'IL-1β qui, au contraire, diminue son expression. Bien que tous les facteurs de transcription n'aient pas été identifiés, on connaît un site de liaison pour AP-1 et pour ESE-1.

Il existe plusieurs isoformes d'Ang1 avec des propriétés différentes. En effet, hormis la forme longue d'Ang1 (1.5 kb) on retrouve 3 isoformes : 1.3 kB , 0.9 kB et 0.7 kB. Les isoformes 1,5 et 0,9 contrairement à l'isoforme 1.3 lient fortement le récepteur Tie2 mais seule la forme longue est capable de l'activer. La forme 1.3 peut se dimériser avec la forme longue. Les isoformes 1.3 et 0.9 joueraient un rôle de dominant négatif de la forme longue, permettant une régulation complexe de l'angiogenèse. Une forme similaire d'Ang1, avec une mutation d'une cystéine en serine, notée Ang1* semble avoir les mêmes propriétés que la forme native (Eklund, L., *et al. - 2006,* Huang, Y. Q., *et al. - 2000,* Jones, N., *et al. - 2001*).

L'inactivation d'Ang1 aboutit à une létalité embryonnaire à E12.5, avec un réseau vasculaire immature sans recrutement de cellules péri-vasculaires et des vaisseaux dilatés (Suri, C., *et al. - 1996*). Chez l'adulte, on retrouve Ang1 exprimée dans de nombreux tissus comme le système nerveux central, les intestins, les organes génitaux et, en plus faible proportion, dans le cœur et le foie. Toutes ces données suggèrent qu'Ang1 permet le maintien de l'intégrité vasculaire (Eklund, L., *et al. - 2006*).

Ang2, clonée en 1997 par Maisonpierre, est une glycoprotéine de 62-70 kD retrouvée, chez l'adulte, dans les sites présentant un remodelage vasculaire (ovaire, utérus et placenta). Contrairement à Ang1, Ang2 est une forme secrétée et stockée dans le cytoplasme des cellules endothéliales à l'intérieur de vésicules appelées « Weibel-Palade bodies ». Cette forme de stockage permet une sécrétion rapide d'Ang2 (Fiedler, U., *et al. - 2004*). Son expression est augmentée en cas d'hypoxie mais aussi par des facteurs inflammatoires comme le TNF-α, β ou encore le VEGF. Il existe une isoforme d'Ang2 résultant d'un épissage alternatif de 52 acides aminés au niveau du domaine coiled-coil. Cette isoforme est capable de lier le récepteur Tie2 mais n'induit pas son activation. Elle semble donc jouer aussi dans la régulation de l'angiogenèse (Eklund, L., *et al. - 2006,* Jones, N., *et al. - 2001,* Kim, I., *et al. - 2000*).

Ang3 et **Ang4** ont été identifiées par similarité dans la structure primaire avec Ang1 et Ang2 et leur capacité à lier le même récepteur. Cependant, leurs fonctions sont beaucoup moins connues. Ang3 souris est exprimée à un niveau faible dans la plupart des tissus alors que Ang4 est retrouvée de façon importante dans le foie. A l'inverse d'Ang1 et Ang2, Ang 3 est capable de se lier à la membrane par sa liaison aux héparanes sulfates (Eklund, L., *et al. - 2006*).

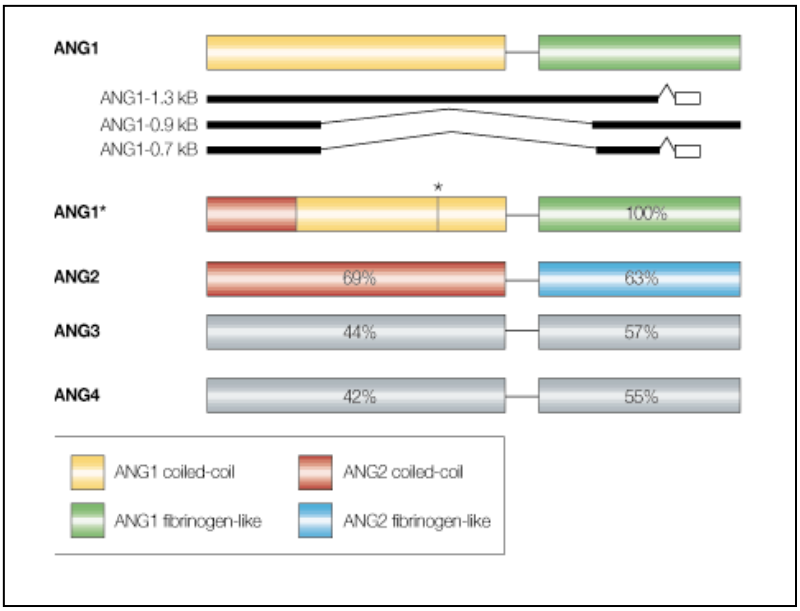


Figure 32:
Famille des angiopoiétines et leurs isoformes. Les nombres indiquent le pourcentage d'homologie avec Ang1
D'après (Jones, N., et al. - 2001)

B.2.2 Complexe Ang/Tie

B.2.2.1 Récepteurs des angiopoiétines

On décrit deux récepteurs aux angiopoiétines : Tie1 et Tie2. Il s'agit de récepteurs tyrosine kinase localisés notamment sur les cellules endothéliales.

Tie2 est une protéine de 140 kDa faisant partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase. L'inactivation de Tie2 est létale au stade embryonnaire E10, par raréfaction des bourgeons vasculaires, associé à une désorganisation et une dilatation vasculaire (phénotype similaire au KO de l'Ang1). Bien qu'il ait été découvert et identifié en 1993 par Runting comme un récepteur spécifique des cellules endothéliales, on le retrouve présent sur d'autres types cellulaires comme les fibroblastes, les neutrophiles, et, de façon intéressante sur les neurones et les cellules gliales favorisant la neuroprotection ou la migration (Poncet, S., *et al. - 2003*). Les sites de liaison des différents facteurs de transcription ne sont pas encore identifiés mais on retrouve un site pour des facteurs de transcription membres de la famille ETS (*l'ETS-related factor-2 (NERF-2)*) et ELF-1 (*E74-like factor 1*) dont NEFR-2 (Dube, A., *et al. - 1999*). Au niveau de la régulation de ce récepteur, l'hypoxie et le VEGF augmentent de façon transitoire son expression.
Le récepteur Tie2 est composé d'un domaine extracellulaire contenant trois domaines EGF-like encadrés par 2 domaines IgG-like et 3 répétitions de type fibronectine de type III. Les domaines IgG-like sont nécessaires à la liaison des ligands Ang1, 2, 3 et 4 (Macdonald, P. R., *et al. - 2006*) (Figure 33).

Tie1 est encore très mal défini bien que découvert et cloné en 1992 par Partanen. L'inactivation de Tie1 est aussi létale, depuis le stade embryonnaire E14 jusqu'à la naissance, avec, hémorragies secondaires, malformations vasculaires, notamment perte de l'intégrité des vaisseaux (Sato, T. N., *et al. - 1995*). Il est régulé de façon positive par l'hypoxie et l'interleukine 11. D'autre part, il a été montré que l'expression de Tie1 est régulée par les forces de cisaillement. En effet, il est sur-exprimé dans les régions dont le débit sanguin est interrompu.
Comme Tie2, il possède un domaine extracellulaire ayant 33% d'homologie avec Tie2 et un domaine intracellulaire avec 76% d'homologie. Aucun ligand spécifique n'a été encore défini, bien que Ang1 et Ang4 soient capables d'induire sa phosphorylation (Jones, N., *et al. - 2001*).

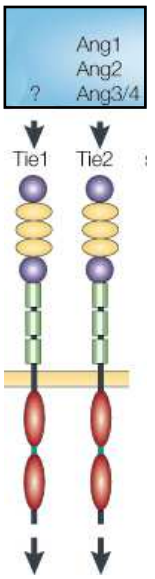


Figure 33:
Récepteurs Tie et ligands associés
D'après (Jones, N., et al. - 2001)

IgG-like
EGF-like
Fibronectine III
Intracellulaire

B.2.2.2 Activation du système Ang1/Tie2 (D'après Makinde T 2008)

La fixation d'Ang1 sur Tie2 induit une dimérisation du récepteur, activant le domaine kinase et une autophosphorylation des résidus tyrosine (Murray, B. W., *et al. - 2001*). Ces sites phosphorylés permettent la liaison de nombreux effecteurs qui induisent l'activation de nombreuses voies intracellulaires responsables des fonctions de survie cellulaire et de migration cellulaire ainsi que des effets anti-inflammatoires et « anti-perméable ».

Comme pour VEGF, la PI3K a été identifiée comme un acteur majeur dans la **survie cellulaire.** L'activation des MAP kinase ERK1/2 et de Akt par phosphorylation permet une sur-régulation de protéines anti-apoptotiques (survivine), ou une diminution de protéines pro-apoptotiques (caspases 9, 7 et 3). On note que la PI3K active des voies pro-apoptotiques via l'activation de la p38 MAPkinase, cependant cette voie est très faible en comparaison aux voies de survie. On

décrit aussi dans cette fonction biologique, un rôle de la voie STAT et celui d'un inhibiteur de NFkB : ABIN-2 (*A-20-binding inhibitor of NFkB*) (Figure 34. A).

La **migration** et le « **sprouting** » des cellules endothéliales dépendent dans un premier temps de la voie PI3K qui permet un remodelage du cytosquelette, par la phosphorylation de FAK. De plus, une augmentation des enzymes fibrinolytiques (la plasmine, MMP2 pro-MMP3 et pro-MMP9) ou une diminution de l'inhibiteur TIMP-2 sont rapportées. Bien que l'on ne connaisse pas totalement les voies d'induction des ces enzymes, il semble qu'une activation de la PI3K soit requise (Kim, I., *et al. - 2000*). Dans la mobilité des cellules endothéliales, la phosphorylation de Dock-R (*Downstream-of-kinase related protein*) permet son interaction avec Nck pour une activation optimale de PAK (*P21 activating kinase*) (Master, Z., *et al. - 2001*). On retrouve aussi dans cette fonction biologique une activation de la voie MAPK par les protéines adaptatrices Grb2. Enfin une dernière voie de signalisation a été identifiée dans cette fonction biologique la voie Rho/Rac1 activée par la NADPH oxidase (Harfouche, R., *et al. - 2005*) (Figure 34. B).

L'effet **anti-inflammatoire** d'Ang1/Tie2 passe notamment par la diminution de l'activité de NFkB (via l'activation d'ABIN-2), ainsi qu'une diminution de l'adhérence des neutrophiles, de la production d'IL-8, ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*) ou VCAM (*Vascular cell Adhesion Molecule*). Cependant toutes les voies impliquées ne sont pas encore connues, notamment celles responsables des effets **anti-perméables** d'Ang1. On sait seulement que l'activation de Tie2 induit une augmentation des protéines des jonctions comme l'occludine, PECAM (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) ou VE-cadherine (Figure 34. C).

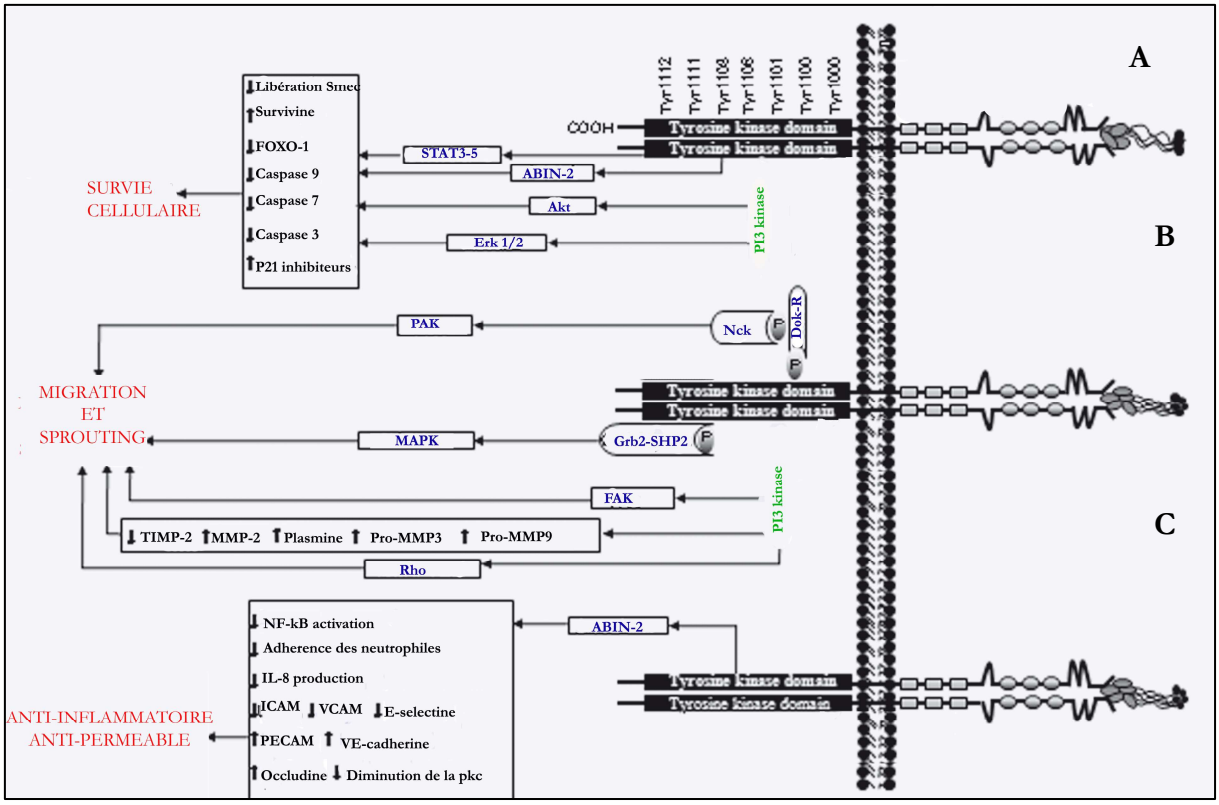


Figure 34: *Voies de signalisation suite à l'activation de Tie2 par Ang1*

A. Voies de survie cellulaire

B. Voies de migration et de « sprouting »

C. Voies anti-inflammatoires et « anti-perméables »

D'après (Makinde, T., et al. - 2008)

B.2.2.3. Activation de Tie2 par Ang2

L'**Ang2** est à la fois antagoniste et agoniste de Tie2 selon les facteurs environnants, particulièrement le VEGF. L'hypothèse actuelle est que la liaison d'Ang2 sur Tie2 n'active pas de voies spécifiques mais interfère avec les effets stabilisant d'Ang1, rendant les vaisseaux plus sensibles à d'autres facteurs angiogéniques, notamment le VEGF. En effet, Ang2 active à la fois les voies : p38-MAPK (pro-apoptotique) et ERK1/2 (anti-apoptotique), P38 MAPK étant dominante. De plus, Ang2 est capable d'inhiber l'activation d'ERK1/2 induite par le VEGF (Harfouche, R., *et al. - 2005*). Enfin, des études montrent un effet chimiotactique d'Ang2 uniquement dans certaines cellules, confirmant qu'Ang2 agit différemment selon le type cellulaire (Eklund, L., *et al. - 2006,* Makinde, T., *et al. - 2008*).

B.2.2.4. Régulation de la signalisation de Tie2

De nombreuses voies régulent l'expression et la signalisation de Tie2.

L'activation par Ang1 induit l'internalisation et la dégradation de Tie2 par le système ubiquitine/proteasome, de la même façon que pour d'autres récepteurs comme EGFR.

L'internalisation du récepteur permet de maintenir l'homéostasie. Après l'internalisation du récepteur, l'Ang1 n'est pas dégradé mais relargué à la membrane des cellules endothéliales (Bogdanovic, E., *et al. - 2006*) (Figure 35.A).

Il existe une forme clivée et soluble de Tie2 (*sTieFc*) ne contenant que la partie extracellulaire, retrouvée dans le plasma de patients sains et avec une concentration élevée dans des conditions pathologiques comme la rétinopathie diabétique. Le clivage de Tie2 peut-être effectué par différents facteurs comme le bFGF ou le VEGF, par une voie dépendante de la PI3K/Akt. sTieFc semble être un régulateur physiologique de Tie2, car en présence de sTie2Fc, l'effet chimiotactique de Ang1-Tie2 est inhibé (Findley, C. M., *et al. - 2007,* Reusch, P., *et al. - 2001*) (Figure 35 B).

Une autre voie de régulation de ce système passe par les phosphatases associées à Tie2 qui régulent l'activité des kinases, comme la phosphatase shp2 dont l'inhibition suractive Akt. Certaines phosphatases sont spécifiques des cellules endothéliales : la VE-PTP (*vascular endothelial protein tyrosine phosphatase*) ou encore la HCPTPA (*human cellular protein tyrosine phosphatase A*). VE-PTP prévient la phosphorylation de Tie2 rendant le dimère inactif (Jones, N., *et al. - 2001*) (Figure 35.C).

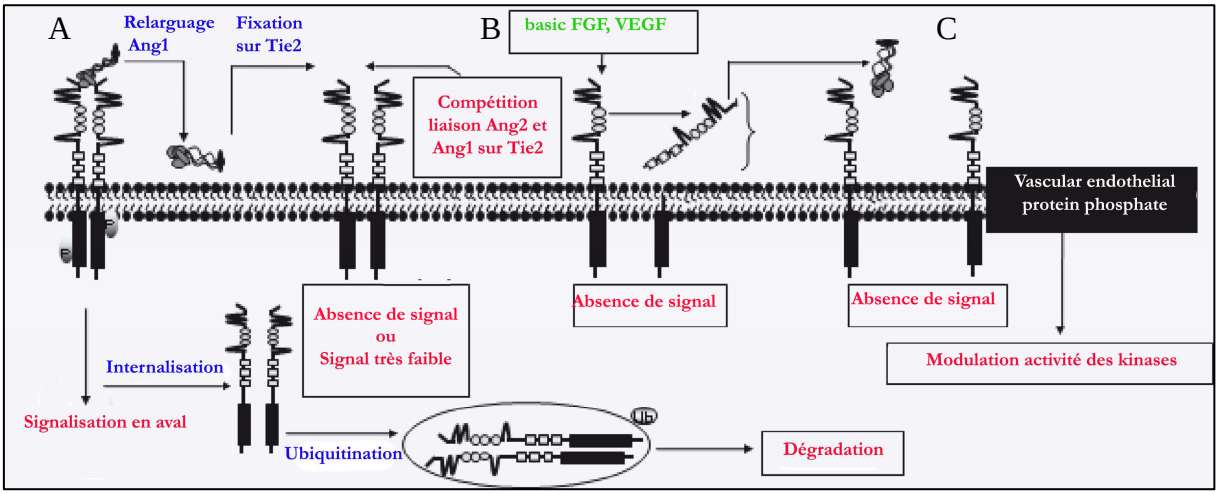


Figure 35: *Voies de régulation de Tie2*

A. Maintien de l'homéostasie

B. Clivage de Tie2 et compétition entre forme soluble et entière

C. Régulation de l'activité kinase par les phosphatases

D'après (Makinde, T., et al. - 2008)

Les intégrines possèdent un rôle très important dans la régulation de Tie2, notamment les intégrines αvβ5 et α5β1. L'intégrine α5β1, activée par les fibronectines, potentialise l'effet d'Ang1

sur Tie2. De plus, Ang1 et Ang2 sont capables de lier directement les intégrines αvβ5 et α5β1 (Makinde, T., *et al. - 2008,* Napione, L., *et al. - 2007*).

B.2.2.5. Autres systèmes de régulation

D'autres voies de régulation on été mises en évidence mais leurs mécanismes d'action sont mal connus. L'équipe de Young W a découvert un système de feedback dans la régulation de Tie2-Ang1 (Hashimoto, T., *et al. - 2004*). Une autre équipe a montré que la délétion de l'extrémité C-terminale de Tie2 conduit à une augmentation de l'activité kinase mettant en évidence un mécanisme d'auto-inhibition de Tie2 (Niu, X. L., *et al. - 2002*). Enfin, Tie1, un récepteur orphelin, participe à la régulation de Tie2 par formation d'hétérodimères (Eklund, L., *et al. - 2006*).

B.3 Autres facteurs angiogeniques

B.3.1 Les cytokines angiogéniques

B.3.1.1 Les chimiokines

Les chimiokines sont une superfamille de cytokines qui lient l'héparine. Elles sont connues pour leur rôle dans le recrutement des leucocytes au niveau des sites d'inflammation. Les chimiokines ont aussi été décrites comme des médiateurs critiques de la néo-vascularisation. La famille des chimiokines humaines compte 50 membres regroupés en 4 groupes basés sur les résidus cystéines présents en N-ter : i) chimiokines CC, dont les résidus cystéines sont adjacents ; ii) chimiokines CXC avec un acide aminé non conservé entre les deux cystéines ; iii) chimiokines C possédant un seul résidu cystéine ; iv) chimiokines CX3C avec 3 résidus non conservés entre les cystéines.
La famille CXC est divisée en 2 groupes par la présence (ELR+) ou l'absence (ELR-) d'un motif d'acide aminé glutamate, leucine, arginine proche de la séquence CXC. Les chimiokines ELR+ sont pro-angiogéniques à l'inverse des chimiokines ELR-.
La famille des ELR+ contient les chimiokines Gro-α (CXCL1), Groβ (CSCL2), Gro-γ (CXCL3), ENA-78 (CXCL5), GCP-2 (CXCL6), NAP-2 (CXCL7), IL-8 (CXCL8), MCP-1 (CCL2), Eotaxin (CCL11) et HCC-4 (CCL16). Deux récepteurs aux chimiokines existent chez l'homme : CXCR1 et CXCR2, exprimées par les cellules endothéliales. Toutes les chimiokines ont la capacité de se fixer à CXCR2, mais seul CXCL8 et 6 peuvent lier CXCR1. L'effet angiogénique passe majoritairement par CXCR2. CXCR1 et CXCR2 sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G qui activent les voies PKC, MAPK, PI3K/Akt

impliquées dans les fonctions biologiques de prolifération, migration ou de régulation de l'apoptose. De plus, IL-8 ou CXCL8 induisent une surexpression de MMP2 et MMP9. Les chimiokines CCL2, 11 et 16 exercent leurs effets angiogéniques via les récepteurs CCR2, 3 et 1 respectivement.

Les chimiokines ELR- : PF-4 (CXCL4), Mig (CXCL9), IP-10 (CXCL10) et I-TAC (CXCL11) inhibent la néo-vascularisation, via le récepteur CXCR3. CXCR3 existe sous 3 formes résultant d'un épissage alternatif : CXCR3A, CXCR3B et CXCR3-alt. La forme B est prédominante dans l'inhibition de l'angiogenèse. Ces chimiokines sont fortement induites par l'interféron-α/β et γ (IFN) et inhibent l'angiogenèse dépendant des chimiokines ELR+ de bFGF et VEGF (Keeley, E. C., *et al. - 2008*) (Figure 36).

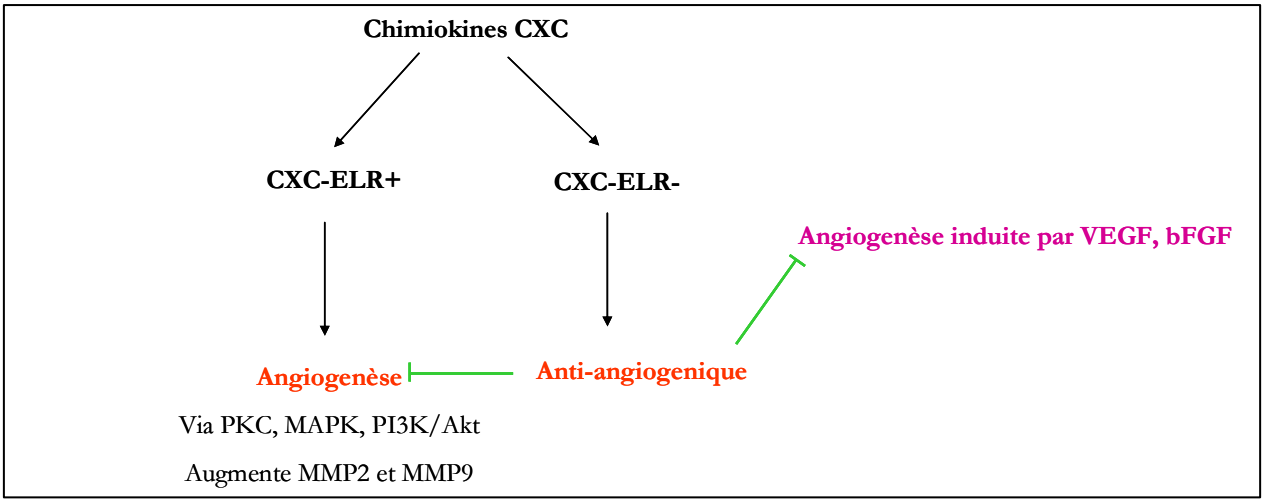


Figure 36 *: Récapitulatifs du rôle des chimiokines dans l'angiogenèse*

B.3.1.2 Les transforming growth factors

La famille des TGF contient 3 membres: les isoformes TGF-β, les activines et les BMPs (*bone morphogenic proteins*). Les membres de la famille TGF-β lient des récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinase de type I et II. Des propriétés pro et anti-angiogéniques du TGF-β ont été découvertes. Des défaillances dans la signalisation de TGF-β provoquent une instabilité des vaisseaux alors que l'inactivation de TGF-β1 est létale par défauts du système hématopoïétique. A des doses faibles, le TGF-β stimule l'angiogenèse par la sur-expression de facteurs angiogéniques. Au contraire lorsque sa concentration est élevée, la croissance des cellules endothéliales est inhibée, la membrane basale est reformée et la stabilisation des vaisseaux est stimulée par recrutement des cellules musculaires (Otrock, Z. K., *et al. - 2007*).

B.3.2 Facteurs angiogéniques solubles et membranaires

On peut citer dans les facteurs angiogéniques solubles les FGFs ou encore le PDGF.

Les **FGFs** sont des protéines mitogènes qui lient l'héparine. L'activité angiogénique passe par la fixation sur 2 des 4 récepteurs FGFR1 et 2. La famille des FGFs contient 22 membres dont 3, FGF1, FGF2 et FGF4, induisent une autophosphorylation des récepteurs, activant de nombreuses voies de signalisation, notamment les MAPK qui induisent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. FGF1, 2 et 4 induisent aussi une surexpression des MMPs et de l'uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) nécessaires à la dégradation de l'ECM (Auguste, P., *et al. - 2005,* Otrock, Z. K., *et al. - 2007*).

La famille des **PDGFs** contient 4 membres, PDGFA, B, C et D, existant sous forme d'homo ou d'hétérodimères. Leurs récepteurs, PDGFRα et PDGFRβ, sont des récepteurs tyrosine kinase. Comme la plupart des facteurs angiogéniques, les PDGF sont impliqués dans la migration et la prolifération mais sont surtout nécessaires à la stabilisation des vaisseaux, via le recrutement de péricytes (Otrock, Z. K., *et al. - 2007*).

De nombreuses **protéines membranaires** jouent un rôle important dans l'angiogenèse, notamment dans l'assemblage vasculaire. Parmi elles : les intégrines, les éphrines et la VE-cadhérine. Les intégrines et la VE-cadhérine ont été détaillée précédemment comme corécepteurs de VEGFR2. Cependant les intégrines peuvent aussi interagir directement avec des facteurs angiogéniques et des métalloprotéases, plus précisément MMP2 (Otrock, Z. K., *et al. - 2007*).
Les récepteurs éphrines (Eph) sont des récepteurs tyrosine kinase possédant un seul domaine cytoplasmique activé par la liaison de leurs ligands, les éphrines. Les éphrines sont présentées au récepteur soit par GPI (éphrines-A (A1-A6)) soit par la région transmembranaire (Éphrines-B (B1-B3)). Il existe donc 2 sous classes de récepteurs EphA (EphA1-A10) ou B (EphB1-B8) selon la nature du ligand. Si les éphrines et leurs récepteurs ont d'abord et surtout été étudiés dans les processus neuro-développementaux de l'embryogenèse, une spectaculaire découverte a montré en 1998 que le récepteur EphB4 se trouvait exclusivement sur les veines alors que son ligand, éphrine B2 n'était porté que par les artères. Leur rôle dans la genèse des veines et des artères initia l'étude des éphrines dans l'angiogenèse (Wang, H. U., *et al. - 1998*). Les animaux invalidés soit pour le gène de l'éphrine B2, soit pour les gènes des récepteurs EphB2 et EphB3, meurent in utero par défaut de vascularisation (Adams, R. H., *et al. - 1999*). Les voies de signalisation des récepteurs des ephrines sont très complexes et mieux connues dans le cas d'EphB. Elle met en

jeu des protéines de type Ras/GAP impliquées dans l'organisation du cytosquelette qui régulent la mobilité des cellules endothéliales (Kuijper, S., *et al. - 2007*).

C. Régulation de l'angiogenèse physiologique et pathologique

L'angiogenèse joue un rôle primordial au cours du développement dans la construction du système cardio-vasculaire, mais contrairement à la vasculogenèse, elle intervient aussi à l'âge adulte. L'angiogenèse est donc un processus très régulé par un ensemble de facteurs angiogéniques inhibiteurs ou activateurs décrits précédemment (Table 5), mais aussi par des stimuli environnementaux.
Lorsque l'équilibre entre ces facteurs est rompu l'angiogenèse devient pathologique.

C.1 Angiogenèse physiologique

C.1.1 Au cours du développement

L'angiogenèse participe à la formation des réseaux vasculaires propres à chaque organe au cours du développement. Le passage de cellules progénitrices à un système de circulation sanguine fonctionnel est très complexe. Il fait intervenir des facteurs intrinsèques (facteurs angiogéniques, voies de signalisation) et des conditions extrinsèques (hypoxie, force du débit sanguin…).
Chaque facteur angiogénique décrit précédemment est impliqué dans le développement vasculaire. En effet des mutations pour VEGF/VEGFR, Ang/Tie2, ephrines, PDGF ou encore TGF-β provoquent des défauts de vascularisation, le plus souvent létaux au stade embryonnaire (Table 6). Chaque facteur a un rôle bien précis à un moment donné : VEGF est nécessaire à l'initiation de la formation vasculaire alors que les systèmes Ang1 et ephrinB2 sont requis pour la maturation et la différentiation veines/artères. Ang1 permet aussi la stabilisation des vaisseaux, étape critique dans la ré-initiation du remodelage vasculaire chez l'adulte (Yancopoulos, G. D., *et al. - 2000*). Une voie de signalisation très importante dans le développement vasculaire est la voie Notch dont les mutations conduisent aussi à des défauts vasculaires. Les 4 récepteurs Notch (Notch 1-4), ont la capacité de lier 5 ligands différents : les delta-like (Dll1, 3 et 4) et jagged (Jag1 et 2). L'étude des différents mutants a révélé un rôle important de Notch dans la spécificité artérielle ou veineuse des cellules endothéliales (Coultas, L., *et al. - 2005*) (Figure 37).

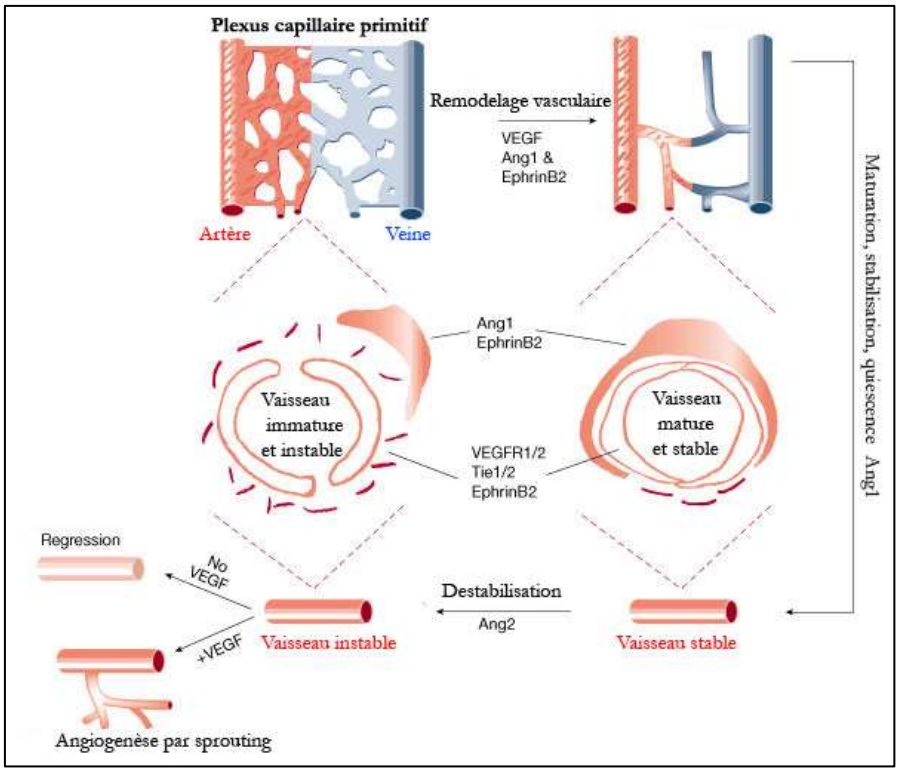


Figure 37*: Angiogenèse physiologique au cours du développement. Mécanismes et facteurs impliqués*
D'après (Yancopoulos, G. D., et al. - 2000)

Le développement du système cardiovasculaire fait aussi intervenir des facteurs extrinsèques comme le degré d'hypoxie ou l'intensité du flux sanguin. Durant l'embryogenèse, après le stade de gastrulation, l'oxygène délivré est très limité. Il existe des gradients d'oxygène qui contribuent à la différentiation et à la maturation du système cardiovasculaire par la production de PDGF, EPO (*Erythropoïétine*), VEGF, enzymes glycolytiques… Ces gènes sont transcrits via l'activation du facteur de transcription HIF et sa stabilisation, décrites précédemment (Coultas, L., *et al. - 2005,* Ramirez-Bergeron, D. L., *et al. - 2004*).

C'est en 1893 que Toma décrivit un rôle important du flux hémodynamique par l'observation d'un élargissement des vaisseaux quand le débit est élevé et une régression lorsque le débit est plus faible. En 1926 apparut la notion de force de cisaillement (shear stress) par le débit sanguin : l'augmentation des forces de cisaillement provoque une activation plus importante des voies L-arginine/NO. Le NO augmente non seulement l'activité des MMPs mais il agit directement sur leur production. De plus les forces de cisaillement sont capables d'altérer l'expression de facteurs comme le FGF ou encore le PDGF (Coultas, L., *et al. - 2005*).

Dans un second temps, l'angiogenèse permet le développement vasculaire des organes. Il se fait le long de l'axe de l'aorte dorsale, formée par le recrutement de cellules précurseurs en réponse au

VEGF. Lors de la vascularisation des organes, ceux-ci envoient des facteurs angiogéniques qui induisent la spécialisation des cellules endothéliales. Dans le foie, en réponse au VEGF, les cellules endothéliales vont sécréter de l'IL-6 et du HGF (*hepacyte growth factor*) qui permettent la croissance et la survie des hépatocytes. Dans le cerveau, très tôt au cours de l'embryogenèse, les vaisseaux envahissent le cerveau et convergent vers les ventricules , les cellules endothéliales prolifèrent en étroite interaction avec les précurseurs neuronaux (Coultas, L.*, et al. - 2005*).

C.1.2 A l'âge adulte

Chez l'adulte les cellules endothéliales sont à l'état de quiescence mais conservent un potentiel prolifératif pour des situations particulières. On retrouve en effet de l'angiogenèse dans des conditions comme : l'exercice physique, l'hypoxie, la grossesse et le cycle menstruel, la cicatrisation.

Le **placenta** ayant pour fonction principale l'échange de nutriments et d'oxygène entre la mère et le fœtus, il nécessite une vascularisation importante. Un réseau vasculaire très dense apparait entre les capillaires du fœtus et ceux de la mère au niveau des trophoblastes. Chez la mère, se forme une « artériole maternelle » qui envahit le placenta via des veinules maternelles, permettant la connexion avec les trophoblastes. Pour obtenir ce réseau, le placenta sécrète et exprime un grand nombre de facteurs et récepteurs, notamment PIGF et VEGFR-1. La forme soluble de Flt1 (sFlt1) qui peut lier PIGF et aussi VEGF est retrouvé à taux élevé dans le sérum maternel dans le cas de pré-éclampsie (Coultas, L.*, et al. - 2005*).

L'angiogenèse intervient au cours du **cycle menstruel.** La reconstruction du lit vasculaire se fait dès le début du cycle, constituant un support nécessaire à la régénération et à la prolifération de l'endomètre ; il implique les facteurs angiogéniques VEGF et angiopoiétines.

C.2 Angiogenèse pathologique

C.2.1 Angiogenèse tumorale

Lorsque les tumeurs atteignent 1 à 2 mm^2 leur croissance ralentit car les apports métaboliques diminuent. C'est là qu'intervient le « switch » angiogénique : la « switchbox » est une entité au sein de la tumeur, qui est capable de répondre aux signaux angiogéniques. Elle comporte : i) des entités moléculaires qui répondent aux contraintes extérieures pour l'initiation et la modulation des réponses angiogéniques ; ii) des molécules solubles, inhibitrices ou stimulatrices, capables de réagir avec les molécules cibles des vaisseaux (Bikfalvi, A. - *2006*).

L'angiogenèse tumorale n'est pas un cas particulier d'angiogenèse, car on retrouve les 4 étapes importantes : bourgeonnement, migration, organisation et maturation. L'angiogenèse par « sprouting » est la première forme impliquée et le VEGF-A en est le principal acteur. Son effet vasodilatateur et perméabilisant permet le passage de protéines du sérum, dont la fibrinogène, nécessaire à la formation d'une matrice, qui permet la migration des cellules endothéliales suivant un gradient de VEGF (Figure 38)

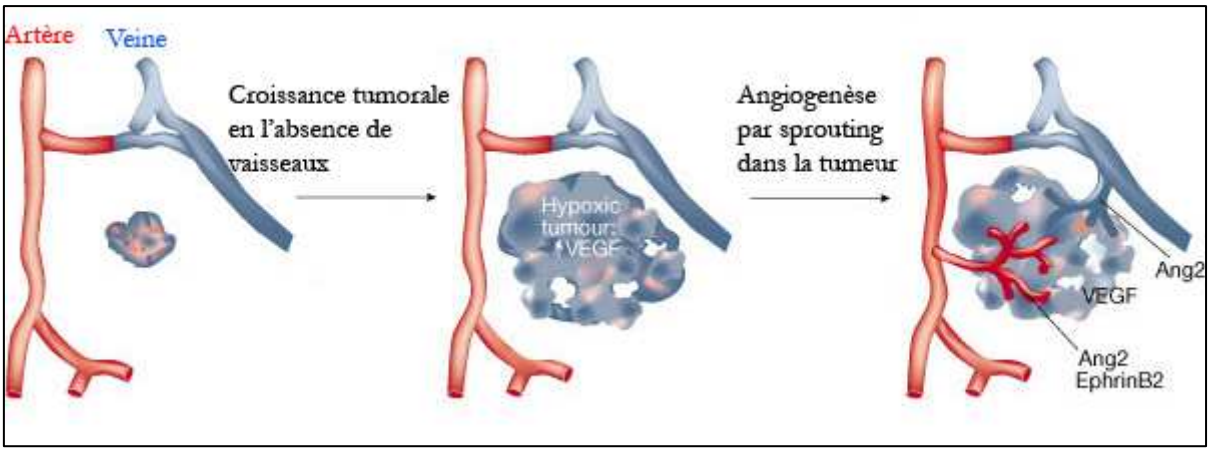


Figure 38: *Angiogenèse tumorale par sprouting*

D'après Yancoupoulos GD,2000

D'autres types d'angiogenèse sont retrouvés dans les tumeurs. En effet, dans un modèle de cancer du colon, il a été montré que 50% de l'angiogenèse se fait de façon intussuceptive. Ce type d'angiogenèse est plus rapide et nécessite très peu d'énergie car il n'y a pas de prolifération cellulaire (Djonov, V. G., *et al. - 2002*). Le mécanisme moléculaire est moins connu, cependant les forces de cisaillement jouent un rôle très important par l'induction de la NOS, le TGF-β ou encore des molécules d'adhésion cellulaire. Les rôles de facteurs angiogéniques tels que le VEGF, l'érythropoïétine ou le PDGF ne sont pas encore connus (Auguste, P., *et al. - 2005*).

Les tumeurs cérébrales ainsi que les tumeurs du foie possèdent une vascularisation très importante dès les stades précoces, due à l'angiogenèse « par cooptation ». Les cellules tumorales entourent les vaisseaux sains. Les cellules endothéliales cooptées sécrètent Ang2 et expriment Tie2, induisant une dissociation du mur cellulaire. De plus, l'activité d'Ang1 est inhibée, ce qui favorise l'apoptose. La diminution du nombre de vaisseaux induit alors une hypoxie qui déclenche très rapidement une angiogenèse (Auguste, P., *et al. - 2005,* Yancopoulos, G. D., *et al. - 2000*) (Figure 39).

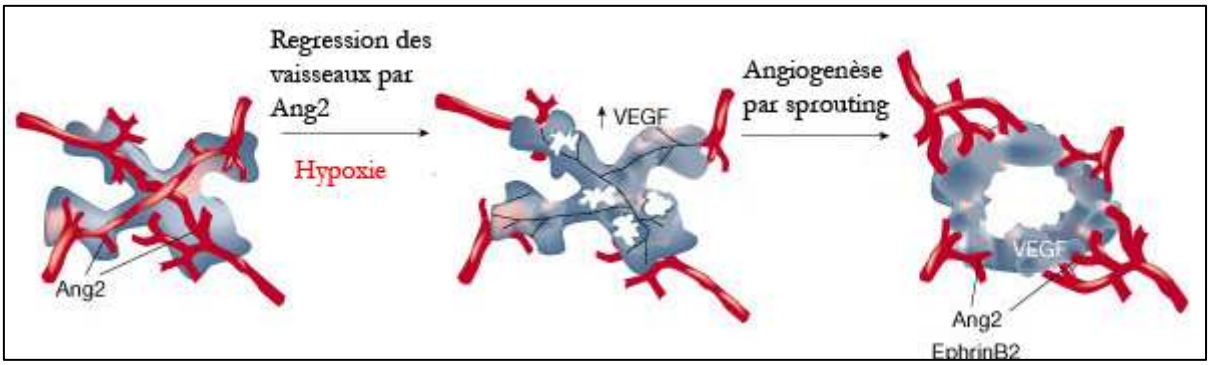


Figure 39: *Angiogenèse tumorale par cooptation*

D'après Yancoupoulos GD-2000

C.2.2 Ischémie cérébrale

Malgré une très haute résistance des cellules endothéliales à l'hypoxie, la réponse des vaisseaux est très rapide et corrélée avec la sévérité de l'ischémie. On retrouve trois grandes étapes : perméabilité, obstruction puis hypoperfusion des vaisseaux au niveau de la zone ischémique. Suite à l'ischémie et à l'œdème, les vaisseaux deviennent très rapidement perméables (1 à 2h post-ischémie), par la perte des pieds astrocytaires autour des vaisseaux, puis par la perte d'adhérence entre les cellules endothéliales due à un grand nombre de facteurs (bradykinine, VEGF, thrombine, MMPs et autres protéases) ayant chacun des rôles propres. En effet, la thrombine augmente l'œdème et le VEGF casse les jonctions entre les cellules endothéliales Cette perméabilité permet le passage de petites molécules comme le fibrinogène et des protéines plasmatiques.

Dans le même décours temporel, des leucocytes migrent vers la zone ischémique via les intégrines et s'accumulent par adhérence au niveau des capillaires. Les intégrines $\alpha v\beta 3$ favorisent aussi l'accumulation de plaquettes et de fibrines, provoquant une occlusion des vaisseaux qui entretient l'inflammation et l'hypoperfusion de la zone ischémique.

L'hypoperfusion, voir l'absence totale de débit sanguin dans la zone ischémique induit une hypoxie locale qui conduit à la stabilisation de HIF-1α. L'hypoxie ainsi que la l'inflammation stimulent de façon différentielle la transcription de facteurs angiogéniques menant à une augmentation du nombre de vaisseaux 3 jours après l'occlusion cérébrale (Figure 40) (Beck, H., *et al. - 2009,* Del Zoppo, G. J., *et al. - 2003*).

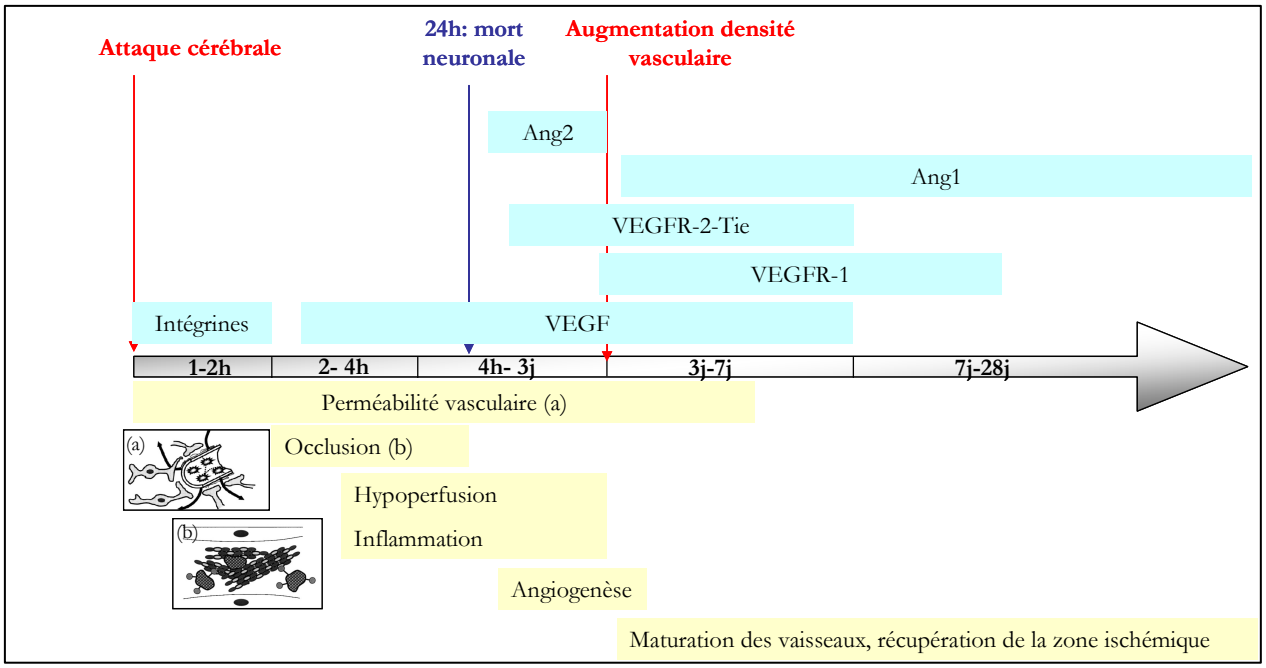
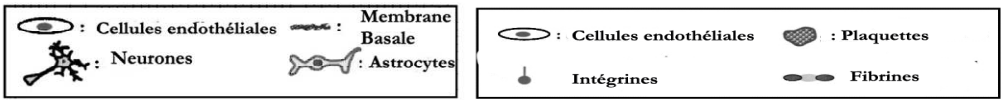


Figure 40: *Décours temporel des évènements et de l'activation des facteurs angiogénique suite à une ischémie cérébrale.*
Illustration D'après (Del Zoppo, G. J., et al. - 2003)



C.2.3 Angiogenèse et rétinopathies

La rétine est un tissu neuronal transparent dont 85% du débit sanguin provient des vaisseaux choroïdiens et 15% de l'artère rétinienne. Trois maladies majeures de la rétine menant à la cécité, présentent un remodelage vasculaire pathologique : La rétinopathie du prématuré (RP), la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) et la rétinopathie diabétique (RD).

La RP touche les enfants nés prématurément. Le développement de la rétine débute la 16ème semaine de grossesse et se termine 1 mois après la naissance. Les enfants prématurés reçoivent un apport en oxygène. Cette hyperoxémie induit un arrêt de l'angiogenèse, inhibant le développement vasculaire de la rétine. L'absence de vaisseaux provoque un phénomène d'hypoxie, réactivant les signaux angiogéniques, notamment VEGF. Il s'en suit une angiogenèse anormale des vaisseaux de la rétine. Ces nouveaux capillaires sont très fragiles et hémorragiques entrainant un détachement de la rétine donc une perte de la vision.

La DMLA affecte les personnes plus âgées. L'angiogenèse des vaisseaux choroïdiens est déclenchée non par un stimulus hypoxique, mais par un déséquilibre entre les facteurs inhibiteurs et stimulants. On retrouve notamment une très forte expression de VEGF chez ces malades. Les

vaisseaux immatures sont perméables aux composants du sang conduisant à un œdème de la macula et un détachement de la rétine.
La RD est une complication des diabètes de type I et II. Au stade précoce de la maladie on rapporte des vaisseaux tortueux et dilatés alors qu'au stade tardif de nouveaux vaisseaux apparaissent à la surface de la rétine. Cette néo-vascularisation de la rétine est la conséquence d'une hypoxie induite par un taux élevé de glucose dans le sang (Penn, J. S., *et al. - 2008*).

C.2.4 La thérapie anti-angiogénique

Le VEGF a été la première cible thérapeutique avec le développement en 1997 du Bevacizumab (Avastin™ Genentech/Roche) (Ferrara, N. - *2002*). Cet anticorps monoclonal reconnait toutes les formes humaines du VEGF-A. Dans un premier temps il fut utilisé en cancérologie. Il est aujourd'hui en phase III pour plusieurs types de cancers, principalement le cancer colorectal et hépatique, et en phase II pour les gliomes. D'autres molécules ciblant le VEGF ont été ensuite développées comme le Ranibizumab (Lucentis™ Genentech/Roche), avec la même cible que le Bevacuzimab mais avec une meilleure affinité. Il existe d'autres thérapies ciblant le VEGF, comme l'Aflibercept (VEGF-trap™, Sanofi-Aventis/Regeneron), protéine de fusion qui lie toutes les isoformes de VEGF, et le pegaptanib (Macugen™, Pfizer), un simple brain d'acide nucleique qui se lie de façon spécifique au VEGF165. Aujourd'hui un grand nombre de thérapies anti-angiogéniques ont été développées et utilisées ou non par mono ou polythérapies. On retrouve aujourd'hui, dans le cas des gliomes, 16 protocoles anti-angiogéniques (mono ou polythérapies) en phase clinique I ou II aux USA ciblant à la fois VEGF mais aussi VEGFR, PDGFR ou encore des voix de signalisation Src (Ferrara, N., *et al. - 2006,* Norden, A. D., *et al. - 2008*).

Ces traitements prometteurs sont aussi appliqués dans d'autres pathologies comme la DMLA. En effet on prescrit déjà des injections intra-oculaires de bevacuzimab, ranibizumab ou pegaptanib. De plus le VEGF-trap ainsi que des cibles du VEGFR-1 sont actuellement en essais cliniques pour cette pathologie (Noel, A., *et al. - 2007*).

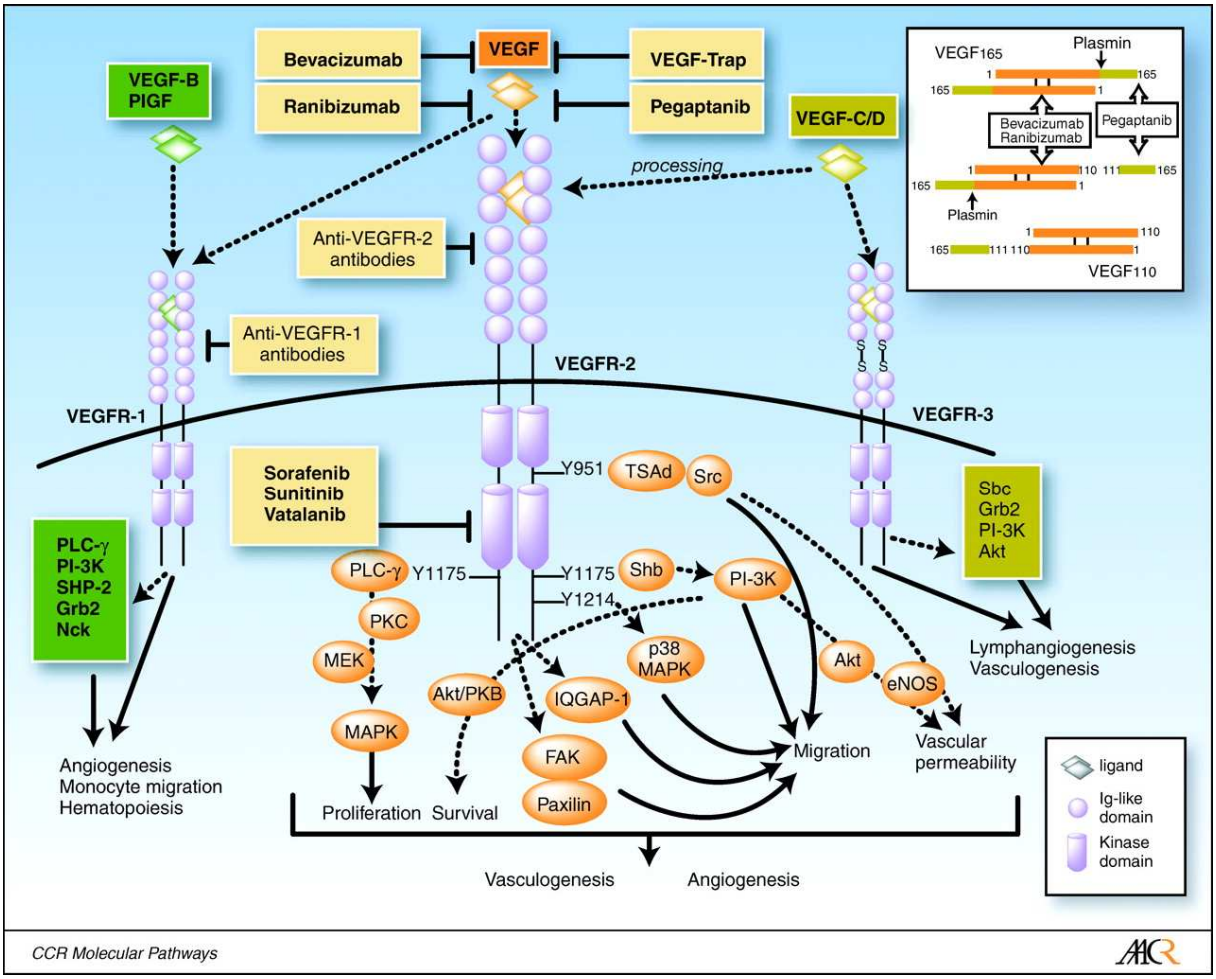


Figure 41 *Thérapies anti-angiogéniques développées en cancérologie*

D'après (Ferrara, N., et al. - 2006)

C.2.5 La thérapie-pro-angiogénique

Après un accident ischémique, que ce soit en périphérie ou dans le cerveau, un processus de neo-vascularisation est réparateur (Zhang, Z. G., *et al. - 2009*). L'angiogenèse peut donc être renforcée dans un but thérapeutique, notamment après une ischémie cérébrale. En effet, la mort neuronale, due à un manque d'oxygène et de nutriments, apparaît 24h après l'attaque, alors que la revascularisation de la zone ischémiée n'est fonctionnelle que 3 jours après. Le but de ces thérapies est donc de stimuler l'angiogenèse pour rétablir au plus tôt le fonctionnement neuronal. Dans un premier temps, les approches pro-angiogéniques sont pharmacologiques. Le VEGF ayant des effets perméabilisant il est exclu dans ce contexte. D'autres molécules augmentant l'angiogenèse ont été retenues, dont certaines sont actuellement en essais cliniques : i) un inhibiteur de la phosphodiesterase-5, le Sildenafil (Viagra™ ou Revatio™, Pfizer) ; ii) un inhibiteur de statines, l'Atorvastine (Lipitor ™, Pfizer) iii) et aussi l'Erythropoiétine recombinante (EPO).

En deuxième thérapie « revascularisante », des approches « physiques » sont proposées pour augmenter l'angiogenèse post-ischémique, comme l'exercice physique qui provoque une vasodilatation mais aussi une sécrétion de facteurs angiogéniques endogènes (Beck, H., *et al.* - *2009*).

INTRODUCTION

CHAPITRE III

BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

En 1885, Paul Elhrich fut le premier à montrer l'existence d'une séparation entre le cerveau et les autres organes : après une injection systémique de colorant, il observa la présence du colorant dans tous les organes sauf le cerveau. Il en conclut donc que le cerveau avait une très faible affinité pour les colorants.

Le terme de barrière fut énoncé pour la première fois en 1898 par Bield et Kraus puis en 1900 par Lawandowsky. En effet, ils montrèrent que les symptômes neurologiques provoqués par l'injection cérébrale d'acide cholique n'étant pas retrouvés lorsque cette drogue était injectée par voie intra-veineuse. La notion de barrière hémato-encéphalique (BHE) fut complètement acceptée en 1913, à la suite des expériences d'Edwin Goldman, étudiant de Paul Elrich. Il montra qu'en injectant par voie intra-cérébrale les colorants utilisés par Paul Elrich, on observait ces derniers seulement dans le cerveau.

Mais c'est seulement à partir des années 1950, que, grâce à la microscopie électronique, les connaissances sur la BHE avancèrent, notamment sur sa localisation et sa constitution. En 1955, les premières investigations soulignèrent l'importance des cellules endothéliales et des pieds astrocytaires. C'est en 1967, que Reese et Karnovsky conclurent que l'endothélium est l'élément essentiel de la BHE en montrant qu'il maintient la peroxydase de raifort (HRP) dans les capillaires. Cette hypothèse fut vérifiée par la suite avec d'autres substances (Ribatti, D., *et al.* - *2006*) (Figure 42).

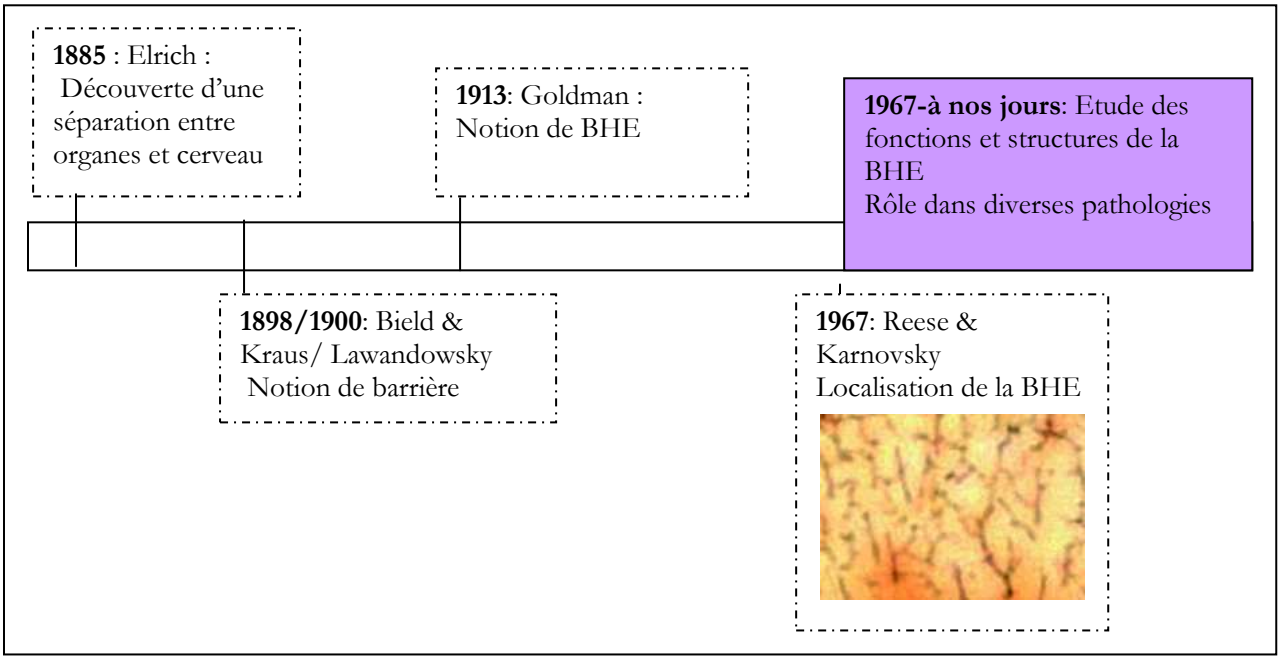


Figure 42 *: Chronologie de la découverte de la BHE*
Photo de microscopie de la HRP dans les vaisseaux

D'après (Ribatti, D., et al. - 2006)

Actuellement, la BHE est divisée en 2 grands systèmes qui assurent le maintien de l'homéostasie cérébrale en laissant entrer seulement les substances nécessaires au bon fonctionnement du cerveau. On distingue une barrière physique et une barrière métabolique, dont nous développerons les caractéristiques par la suite.

A. Barrière hémato-encéphalique ou « unité neurovasculaire »

A.1 Structure de la BHE

L'unité vasculaire est définie comme l'association des cellules endothéliales, de la membrane basale, des péricytes, des astrocytes et des neurones. Chacune de ces cellules possèdent un rôle bien précis, donnant à la BHE trois grandes fonctions (Wolburg, H., *et al. - 2009*):

- Le contrôle des paramètres de la perfusion sanguine différente, d'une région du cerveau à une autre.
- Le maintien des réserves énergétiques permettant un apport aux cellules environnantes, plus particulièrement les neurones, et un retour dans le sang des métabolites produits par le SNC.
- La protection du parenchyme contre les modifications de la composition du sang ou la présence d'éléments neurotoxiques

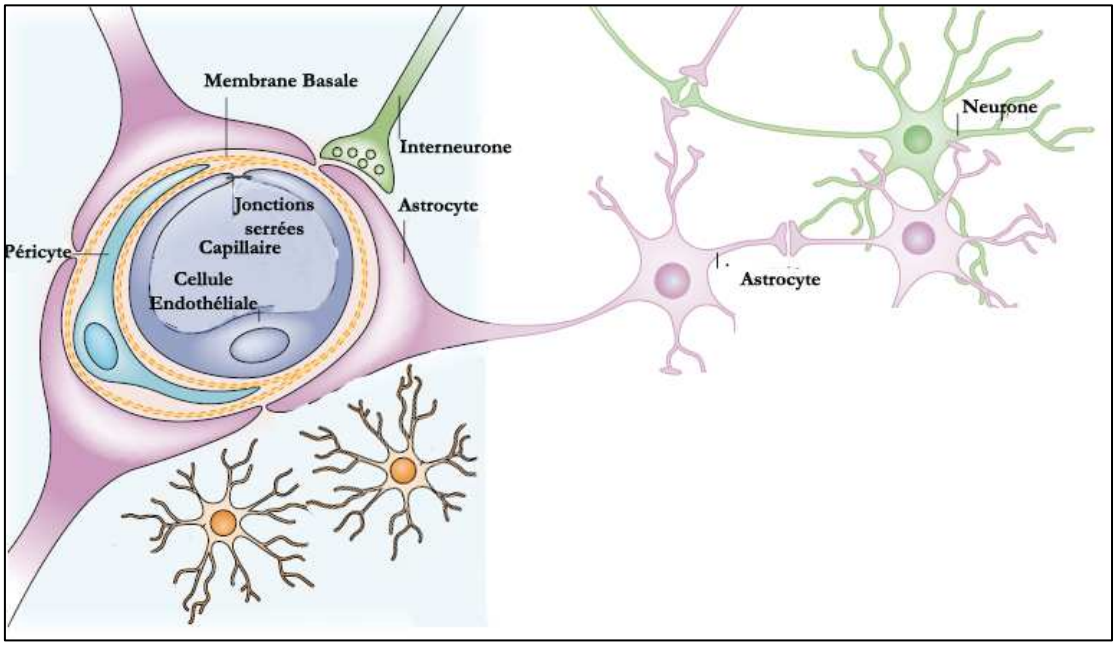


***Figure 43**: Constituants cellulaires de la barrière hémato-encéphalique*
D'après (Abbott, N. J., et al. - 2006)

A.2 Les cellules endothéliales (EC)

Les cellules endothéliales sont situées à l'interface sang-cerveau. Leurs fonctions biologiques sont:

- La formation d'une barrière sang-cerveau
- Le transport des nutriments et des cellules comme les leucocytes
- La signalisation des différents récepteurs en réponse à des signaux
- La régulation de l'osmolarité

Ces différentes fonctions sont possibles grâce au phénotype particulier des cellules endothéliales de la BHE, différent de celles de la circulation périphérique (Persidsky, Y., *et al. - 2006*).

Ces cellules sont caractérisées par leur petite taille et par les jonctions serrées qui confèrent à la BHE une haute résistance électrique transendothéliale (TEER- 1500/2000 ohm/cm2). Le cytoplasme de ces cellules est uniforme et contient très peu de vésicules de pinocytose, impliquées dans le transport non spécifique de solutés et une absence de fenestrations. De plus, ces cellules des capillaires cérébraux contiennent un nombre plus élevé de mitochondries que les cellules endothéliales des autres capillaires, nécessaire pour fournir le potentiel énergétique requis aux transports actifs des nutriments (Oldendorf, W. H., *et al. - 1977*).

Un point commun entre ces cellules et celles de la périphérie est la présence de la membrane basale qui couvre les vaisseaux. Cette dernière est composée de collagène IV, fibronectine et laminine. Elle permet l'ancrage des cellules endothéliales par l'interaction entre les intégrines des ECs et les composants de la membrane basale (Del Zoppo, G. J., *et al. - 2006*). La rupture de cette membrane suffit à induire une perméabilité de la BHE. Quelques études suggèrent que le collagen IV augmente le transcrit de l'occludine menant à l'hypothèse d'un rôle de la membrane basale dans le maintien des jonctions serrées (Savettieri, G., *et al. - 2000*).

Les cellules endothéliales cérébrales forment une **barrière enzymatique** qui permet de métaboliser les drogues et les nutriments. Parmi ces enzymes, on rapporte : la γ-GTP (*γ-glutamyle transpeptidase*), l'AP (*phosphatase alkaline*) et la decarboxylase des acides aromatiques. Ces enzymes en concentration élevée au niveau des capillaires cérébraux, permettent la métabolisation des solutés neuroactifs présents dans le sang (Pardridge, W. M. - *2005*).

Enfin, il existe une polarité au niveau de ces cellules, jouant un rôle très important dans la fonction de la barrière. En effet, les enzymes γ-GTP et AP et différents transporteurs comme

Pgp sont présents du côté apical. Au contraire, au niveau basal on décrit les pompes Na+-K+ ATPase. Des transporteurs tels que GLUT-1 sont localisés à la fois du côté apical et basal. Les jonctions serrées et adhérentes jouent un rôle dans la polarité des cellules par leur ségrégation à la membrane apicale (jonctions serrées) et la membrane basale (jonctions adhérentes) (Abbott, N. J., *et al. - 2006,* Loscher, W., *et al. - 2005*).

A.3 Les péricytes (Lai, C. H., *et al. - 2005*)

Les péricytes ont été décrits comme des cellules périvasculaires adjacentes aux capillaires en 1870 par Rouget (Zlokovic, B. V. - *2008*). Ils sont encastrés dans la membrane basale et participent à la prolifération, la survie, la migration, la différentiation cellulaire et le bourgeonnement vasculaire.

Les péricytes sont des cellules plates, indifférenciées et font partie des cellules contractiles du tissu conjonctif. Ils entourent 30 à 70% des vaisseaux et, dans le cerveau, on compte 1 péricyte pour 3 cellules endothéliales. L'origine des péricytes n'est pas encore totalement élucidée mais ils proviendraient du lignage des cellules musculaires (Allt, G., *et al. - 2001*). Ils sont morphologiquement, physiquement et physiologiquement hétérogènes et ont la propriété de se différentier en cellules « fibroblaste-like », en chondocytes ou encore en adipocytes. De plus, les péricytes du cerveau possèdent des propriétés de macrophages, par leur capacité à phagocyter et à présenter l'antigène (Rucker, H. K., *et al. - 2000,* Sims, D. E. - *2000*).

Leur hétérogénéité confère aux péricytes plusieurs fonctions :

- Ils assurent le maintien de l'intégrité et de la morphologie des vaisseaux, par la sécrétion de différents facteurs angiogéniques, comme l'Ang1. L'absence de ces cellules conduit à une hyperplasie et une morphogénèse anormales du réseau vasculaire dans le cerveau (Von Tell, D., *et al. - 2006*).
- Ils régulent le flux sanguin par l'expression importante d'α-actine contractile et par des seconds messagers comme le calcium et l'AMPc (Peppiatt, C. M., *et al. - 2006*)
- Ils contrôlent la perméabilité de la BHE en fonction des contacts EC-péricytes. Ce contact induit la sécrétion TGF-β1 qui régule le réseau de filaments d'actine des cellules endothéliales, à la fois dans les cellules endothéliales et dans les péricytes. Cependant les mécanismes moléculaires sont encore peu connus et les études, contradictoires, révèlent une régulation complexe selon l'environnement (Dohgu, S., *et al. - 2005,* Dore-Duffy, P., *et al. - 2007*).

A.4 Les neurones

Les corps cellulaires des neurones sont localisés à moins de 10µm autour des capillaires, nécessaire pour l'adaptation de l'approvisionnement en nutriments à l'activité des neurones. Cet approvisionnement des neurones en fonction de leur activité demande une régulation importante de la circulation. Les études menées en imagerie fonctionnelle chez l'homme ou l'animal montrent une étroite relation entre débit sanguin et activité neuronale (Paemeleire, K., *et al. - 2000*).

Les cellules endothéliales associées ou non aux astrocytes sont innervées par des neurones noradrénergiques, serotoninergiques, cholinergiques et GABAergiques. Il a été montré dans la maladie d'Alzheimer qu'une perte de l'innervation cholinergique mène à un défaut dans la fonction cérébro-vasculaire (Cohen, R. M., *et al. - 1997,* Cohen, Z., *et al. - 1997,* Vaucher, E., *et al. - 2000*).

De plus, il est prouvé que les neurones induisent l'expression d'enzymes spécifiques des cellules endothéliales cérébrales De plus les neurones augmentent l'expression des enzymes de la BHE et notamment la GGTP *(gamma-glutamyl transpeptidase)* (Tontsch, U., *et al. - 1991*).

Cependant les mécanismes précis restent encore inconnus (Persidsky, Y., *et al. - 2006*).

A.5 La microglie

La microglie a été découverte en 1932 par de Rio-Hortega. C'est une classe distincte des cellules gliales qui jouent un rôle crucial dans les réponses immunitaires. Elles dérivent de cellules mésenchymateuses et se transforment en microglie une fois entrées dans le cerveau. Une autre source est l'entrée de monocytes/macrophages dans le tissu nerveux, qui se transforment en microglie (Bechmann, I., *et al. - 2005*).

La microglie participe aussi à la perméabilité de la BHE par la sécrétion de cytokines comme l'IL-1β.

A.6 Les astrocytes

Les astrocytes occupent une position stratégique entre les capillaires et les neurones. Ils jouent un rôle important dans la maintenance des propriétés de la barrière, dans le contrôle du flux sanguin mais aussi dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

A.6.1 Homéostasie ion-eau

En fonction de l'activité neuronale, les neurones libèrent des neurotransmetteurs (NT) et des ions généralement recyclés. Les pieds astrocytaires jouent un rôle important dans le maintien l'homéostasie ionique. En effet, ils contiennent des molécules spécialisées, notamment des OAPs (*orthogonal arrays of particles*) contenant des canaux de l'eau, comme l'aquaporine-4 (ACQP-4), et des canaux potassiques (Kir4.1). La localisation d'AQP-4 au niveau des pieds astrocytaires requiert l'agrine, un protéoglycane de la membrane basale, qui couple le transporteur à α1-syntrophine, elle-même liée à Kir4.1. L'AQP4 régule l'homéostasie par une entrée d'eau se traduisant par un gonflement des astrocytes à proximité d'une activité neuronale. Les canaux Kir4.1 confèrent aux astrocytes leur pouvoir tampon par le dépôt du potassium dans l'espace péri-vasculaire permettant un possible recyclage du potassium quand l'activité des neurones cesse. Un recyclage du glutamate, principal neurotransmetteur excitateur, est assuré par les transporteurs astrocytaires EAAT 1 et 2 (*excitory amino acid transporteur*). Dans l'astrocyte, le glutamate est transformé en glutamine, stockée dans l'astrocyte puis libérée et délivrée aux neurones en fonction de leur activité. La glutamine est désaminée en glutamate et reconstitue le pool neuronal.

Cependant ces recyclages se font par des processus actifs impliquant des échanges ioniques, cassant ainsi l'équilibre osmotique des astrocytes (Abbott, N. J., *et al. - 2006,* Simard, M., *et al. - 2004*).

.

A.6.2 Maintien des propriétés de la barrière

Plusieurs évidences suggèrent que les astrocytes participent activement au maintien des propriétés de la BHE, notamment au niveau de :

- **La barrière physique (jonctions serrées)** : La présence d'astrocytes permet d'augmenter les jonctions serrées et de diminuer les jonctions GAP entre les cellules, limitant ainsi les flux non spécifiques. De plus, l'attache correcte des péricytes à la membrane basale pour une maturation complète des vaisseaux, nécessite aussi la présence d'astrocytes (Rubin, L. L., *et al. - 1991*).
- **La barrière des transports** par la localisation polarisée des transporteurs tels que P-gp et GLUT-1 (Mcallister, M. S., *et al. - 2001*).
- **La barrière métabolique** par une sur-expression des enzymes γGTP (Abbott, N. J. - *2002*).

A.6.3 Contrôle du flux sanguin

Le contact entre les astrocytes et les vaisseaux a longtemps suggéré une régulation du flux sanguin par ce contact sans la prouver. Cette hypothèse n'a été démontrée que récemment par le développement des techniques *in vivo* et *in vitro*. Le calcium intracellulaire des astrocytes joue un rôle central dans la vasodilatation. En effet, l'activité neuronale induit la sécrétion de plusieurs facteurs tels que l'adénosine, le glutamate, l'ATP ou la prostaglandine (PGE2). La liaison de ces agents sur leurs récepteurs astrocytaires, provoque, via la voie de l'IP3, l'augmentation de calcium intracellulaire. Celui-ci induit la production de deux facteurs vasodilatateurs essentiels le NO ou la PGE2 qui induisent rapidement une vasodilatation via le cAMP ou le cGMP.
Il est important de noter que le neurone activé est capable de sécréter lui-même PGE2 et NO (Iadecola, C., *et al. - 2007,* Koehler, R. C., *et al. - 2009*).

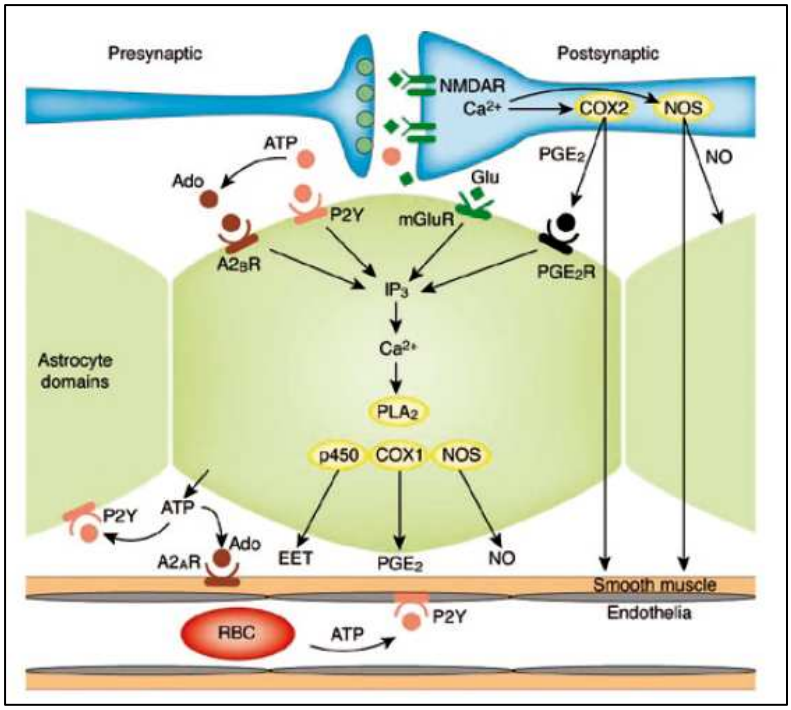


Figure 44 *: Astrocytes et modulation du débit sanguin*
D'après (Iadecola, C., et al. - 2007)

B. Une « barrière métabolique » : transport sélectif

Le cerveau fait face à un dilemme : d'une part, la protection contre les substances toxiques du sang, d'autre part, l'apport des métabolites vitaux présents dans le sang. La protection du cerveau requiert l'obstruction du flux paracellulaire par les jonctions serrées alors que la délivrance des métabolites du sang vers le cerveau nécessite des transporteurs. Ces derniers sont présents à la

fois sur les cellules endothéliales, astrocytes, neurones permettant de réguler l'homéostasie du cerveau (Figure 45).

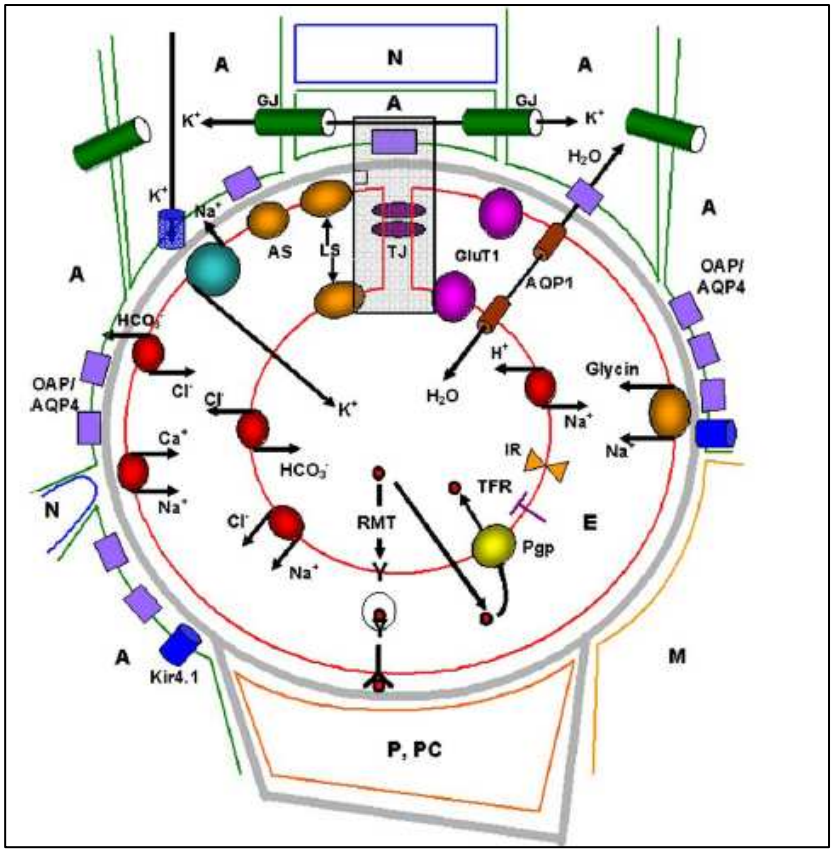


Figure 45 *: Vue schématique des différents transporteurs et récepteurs de la BHE*
A : Astrocytes ; E : Cellules endothéliales ; N : Neurones ; M : Microglie ; P : Péricytes et PC : cellules périvasculaires

D'après (Wolburg, H., et al. - 2009)

La BHE est un large réseau de transports que l'on peut classer en **plusieurs** types:
i) influx assuré par un transporteur ; ii) transport ionique ; iii) efflux actif via la calvéoline. L'efflux actif correspond notamment aux transporteurs multi-drogues développés précédemment (Wolburg, H., *et al. - 2009,* Zlokovic, B. V. - *2008*).

B.1 Le transport via un transporteur

Ce type de transport est surtout retrouvé pour l'apport, ou le contrôle, de nutriments et notamment le glucose, les acides aminés (AA), nucléosides et vitamines. Ces transports se font le plus souvent du sang vers le cerveau (Figure 46) (Zlokovic, B. V. - *2008*).

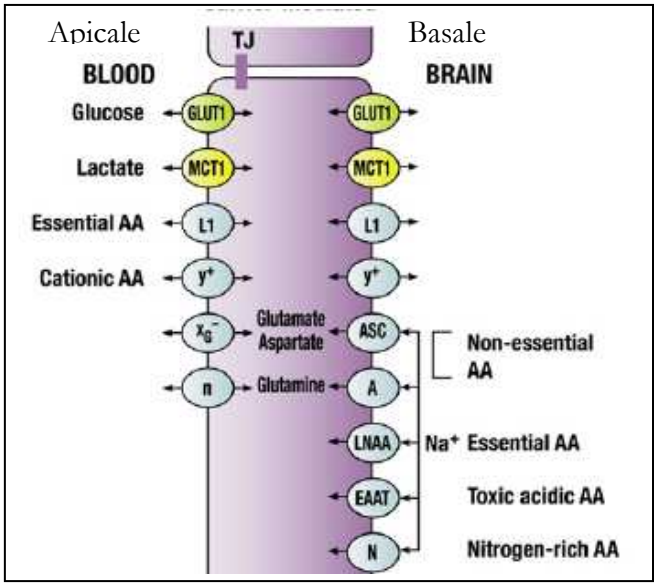


Figure 46 *: Transport par un transporteur*

D'après (Zlokovic, B. V. - 2008)

B.1.1 Transport du glucose

Glut1 fait partie de la famille des transporteurs du glucose indépendants du sodium, comprenant 5 membres. Il est restreint aux cellules endothéliales du cerveau préférentiellement du côté de la lumière et à plus forte densité du côté abluminal. Cette plus forte concentration vers le cerveau limite ainsi l'accumulation du glucose (Simpson, I. A., *et al. - 2007,* Zlokovic, B. V. - *2008*).

Glut1 possède 12 domaines chevauchants qui rendent la cristallisation très difficile. Cependant on suppose qu'un changement de structure a lieu lors de la capture du glucose. L'ATP joue un rôle dans l'import/export de glucose en augmentant l'affinité de Glut-1 pour son substrat (Hruz, P. W., *et al. - 2001,* Qutub, A. A., *et al. - 2005*). L'expression de Glut1 est sous le contrôle de HIF-1 mais aussi de facteurs tels que TNF, bFGF ou encore VEGF (Qutub, A. A., *et al. - 2005*).

Même si Glut1 est considéré comme le principal transporteur du glucose, d'autres transporteurs activés par les gradients ioniques permettent le passage de glucose à travers la BHE, notamment le co-transporteur du glucose dépendant du sodium : SGLT qui stimule le transport du glucose via Glut1 au niveau de la membrane basale (Nishizaki, T., *et al. - 1995*).

Il est intéressant de noter que les astrocytes expriment aussi les transporteurs du glucose Glut1, 2 et 4 alors que les neurones présentent Glut3, 4 et 8, qui permettent le métabolisme du glucose (Apelt, J., *et al. - 1999,* Leloup, C., *et al. - 1994*).

B.1.2 Transport des acides aminés

Le transport des acides aminés nécessite plusieurs types de transporteurs, indépendants (L1, Y+) ou dépendants (EAAT, glutamine transport et NAA) au sodium (Table 7) (Bernacki, J., *et al. - 2008,* Zlokovic, B. V. - *2008*).

Transporter	Na^+-dependent/facilitative	Membrane		Substrates
		Luminal	Abluminal	
L1	–/+	++[1]	+	Asn, Gln, Leu, Val, Met, His, Ile, Tyr, Trp, Phe, Thr
y^+	–[2]/+	+	++	Lys, Arg, Orn, homoarginine
x_G^-	–/+	+	–	Asp, Glu
n	–/+	+	–	Asn, Gln, His
Na^+-LNNA	+/–	–	+	Gly, Ala, His, Thr, Met, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp
A	+/–	–	+	Ala, Ser, Pro, Asn, Gln
ASC	+/–	–	+	Gly, Ala, Ser, Thr, Met, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp
N	+/–	–	+	Ser, Asn, Gln, His
EAAT	+/–	–	+	Asp, Glu

***Table 7** : Transporteurs des acides aminés localisés sur les cellules endothéliales de la BHE*

D'après (Bernacki, J., et al. - 2008)

Transport indépendant du Na+

Le transporteur **L1** (*Large neutral amino acid*) permet le passage d'un grand nombre d'AA neutre comme par exemple la leucine, valine, méthionine, tryptophane, tyrosine... On le retrouve sur les deux membranes mais il semble être plus abondant du côté de la lumière. Bien que le transport soit indépendant du Na+ il semble être facilité par ce dernier.

Le **système Y+** permet le passage d'AAs présentant une chaine cationique comme la lysine ou l'arginine. Ce dernier est aussi présent sur les deux membranes mais en densité plus importante sur la face abluminale.

Les systèmes dépendants du sodium incluent le système A (*alanine*), ASC (*alanine, sérine, cystéine*), N (*glutamine, asparagine et histine*), EAAT et enfin Na+-LNAA (*essential large neutral amino acid*). Ces transporteurs sont présents au niveau du parenchyme, permettant l'élimination des AAs vers le sang (Bernacki, J., *et al. - 2008*).

Le **système A** est sensible au voltage, transportant préférentiellement l'alanine et inhibé par la proline, histidine, serine, asparagine ou la glutamine. On retrouve 3 isoformes de ce système ATA1-3 avec une forte expression d'ATA2 au niveau de la BHE (Bernacki, J., *et al. - 2008*).

Les **systèmes ASC** et **N** sont voltage-indépendants et responsables du transport des AAs cités dans la Table 7 (Bernacki, J., *et al. - 2008*).

Les transporteurs **EAAT** permettent le passage du glutamate et de l'aspartate vers le sang. Ils sont dépendants du voltage et sensibles au potassium. Il en existe 3 types : EAAT1, 2 et 3 nommés GLAST (EAAT1) et GLT-1 (EAAT2) chez le rat. On retrouve EAAT4 et EAAT5 au niveau du cervelet et de la rétine, respectivement. La fonction première de ces transporteurs est d'éliminer les AA toxiques dans le SNC.
On retrouve notamment EAAT3 et le système N au niveau des neurones, permettant le stockage de glutamate pour la transmission synaptique. Au niveau des astrocytes on retrouve EAAT1-3 permettant la capture du glutamate qui sera ensuite converti en glutamine puis relargué (Hawkins, R. A., *et al. - 2006*).

B.2 Transport de peptides, de protéines et calveoline

On compte dans cette catégorie à la fois les **peptides neuroactifs** comme l'arginine vasopressine (AVP) et les enképhalines, mais aussi les cytokines ou les chimiokines (Wolburg, H., *et al. - 2009,* Zlokovic, B. V. - *2008*).

Les transporteurs principaux sont les PTS (*peptide transport system*) retrouvés au nombre de 4 : PTS-1-4. PTS-1 et 2 du côté du parenchyme, permettant le passage des enképhalines et de l'AVP vers le sang (Banks, W. A. - *2006*). De plus, le récepteur V1-vasopressinergique permet, lui-aussi, le passage de l'AVP vers le sang (Zlokovic, B. V., *et al. - 1990*). PTS-3, au contraire, est retrouvé du côté du sang permettant l'apport du peptide T au cerveau.

Les grosses **protéines,** telles que transferrine, leptine ou encore immunoglobuline (IgG) utilisent des récepteurs pour leur passage à travers la BHE. Les récepteurs sont contenus dans des membranes calveolaires, qui contiennent la calveoline-1, entrainant l'endocytose du récepteur et de son ligand, ce qui permet le passage des grosses protéines à travers la BHE (Deane, R., *et al. - 2005,* Wolburg, H., *et al. - 2009,* Zlokovic, B. V., *et al. - 2000*)) (Figure 47).

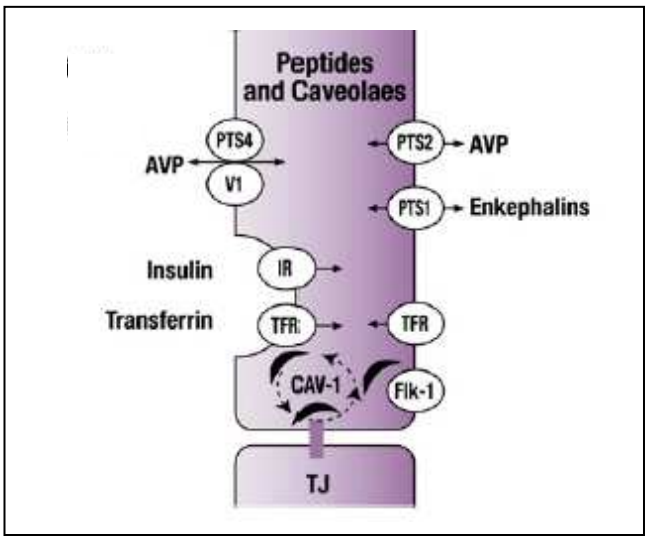


***Figure 47** : Transport des protéines*

D'après (Zlokovic, B. V. - 2008)

B.3 Le transport ionique

De nombreux transporteurs ioniques sont présents au niveau de la BHE, plus particulièrement au niveau des cellules endothéliales, jouant un rôle important dans l'homéostasie ionique (Figure 48).

La pompe **Na+/K+/ATPase**, présente sur le côté abluminal, régule l'influx Na+ vers le cerveau par échange de potassium, permettant de relarguer ce dernier dans le sang quand l'activité neuronale est élevée ((Zlokovic, B. V. - *2008*).

Les co-transporteurs **Na+/K+/2Cl-**, présents au niveau de la membrane luminale, permettent le passage de sodium, potassium et de chlore du sang vers le cerveau (O'donnell, M. E., *et al. - 2006*).

Le co-transporteur **Na+/Ca2+,** présent sur la membrane basale, est impliqué dans l'efflux de calcium et de sodium dans les cellules endothéliales (Zlokovic, B. V. - *2008*).

Enfin on retrouve les transporteurs **Na+/H+ et Cl-/HCO3-** nécessaires pour la régulation du pH de l'endothélium (Taylor, C. J., *et al. - 2006,* Zlokovic, B. V. - *2008*).

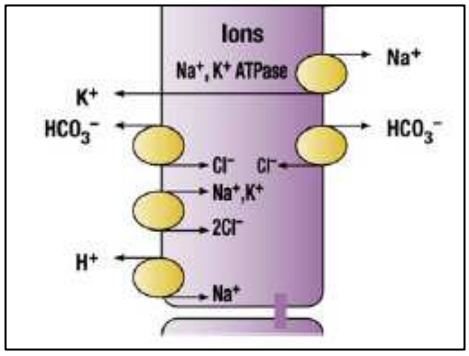


***Figure 48**: Transport ionique*

D'après (Zlokovic, B. V. - 2008)

C. Barrière « physique » : Jonctions adhérentes et serrées

Les cellules endothéliales jouent un rôle de barrière permettant le contrôle de l'infiltration de protéines sanguines et de cellules circulantes dans les tissus. La perméabilité de cette barrière est assurée par les voies paracellulaires et transcellulaires. La voie paracellulaire est contrôlée par les jonctions **jonctions adhérentes** (AJs) et les **jonctions serrées** (TJs). On retrouve aussi au niveau jonctionnel des protéines d'adhésion telles que PECAM-1 ou encore CD34 qui clustérisent les cellules entre elles mais sont distinctes des AJs et TJs (Dejana, E., *et al. - 2008*).

C.1 Jonctions adhérentes (AJs)

Les jonctions adhérentes sont des complexes de protéines qui permettent le contact entre les cellules. Lors du développement embryonnaire, ces contacts sont nécessaires pour la régulation de la morphogénèse ou la formation des tissus. Chez l'adulte, ces jonctions permettent la maintenance des tissus (Gumbiner, B. M. - *1996*). Les jonctions adhérentes sont ubiquitaires et distribuées tout au long de l'arbre vasculaire, à la fois dans les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques.

La principale protéine des jonctions adhérentes est la cadhérine, qui connecte les cellules adjacentes via des interactions homophiliques, et sont liées au cytosquelette via les caténines (Ebnet, K. - *2008*).

C.1.1 Le complexe Cadhérines/ Caténines

C.1.1.1 Cadhérines

Les cadhérines sont des glycoprotéines présentes à la surface des cellules dont le fonctionnement dépend du calcium. Chez les mammifères, 80 protéines appartenant à la superfamille des cadhérines, ont été identifiées, incluant les cadhérines classiques, les desmocollines, les proto-cadhérines, les cadherine-neuronal related receptors (CNRs), les Fat-like cadherins….

Chaque cadhérine possède un domaine extracellulaire contenant de 1 à 34 copies de l'unique domaine extracellulaire (ECD). Les domaines ECD contiennent des séquences chargées négativement, impliquées dans la liaison du calcium. Le domaine cytoplasmique diverge selon le membre de la famille (Rudini, N., *et al. - 2008*).

Les AJs sont constituées des **cadhérines classiques** caractérisées par la présence de 5 domaines ECDs et d'un domaine cytoplasmique conservé liant les caténines. Les domaines

transmembranaires et intracellulaires jouent un rôle dans la dimérisation et la multidimérisation (Figure 49).

Les cellules endothéliales expriment plus particulièrement la **vascular-endothelial (VE)-cadhérine** présentes sur toutes les cellules endothéliales et tous les types de vaisseaux sanguins (Dejana, E., *et al. - 1999*). La spécificité cellulaire de la VE-cadhérine s'explique par la structure de son promoteur. En effet, il contient 3 domaines importants pour la régulation transcriptionnelle : un domaine proximal induisant une transcription non spécifique et 2 régions qui abolissent la transcription dans les cellules non-endothéliales (Gory, S., *et al. - 1999*). Les souris KO pour la VE-cadhérine meurent au stade embryonnaire d'un déficit vasculaire indiquant un rôle important de cette protéine dans l'intégrité vasculaire.

Même si la VE-cadhérine est prédominante dans les AJs, on retrouve au niveau des cellules endothéliales la **N-cadhérine**, la **T-cadhérine** et aussi la **P-cadhérine**. Les fonctions de la T-cadhérines et de la P-cadhérines restent encore inconnues (Bazzoni, G., *et al. - 2004,* Ivanov, D. B., *et al. - 2001*).
La N-cadhérine est exprimée à des taux similaires à ceux de la VE-cadhérine. Cependant, en présence de VE-cadhérine elle est absente des AJs. La N-cadhérine induit une adhésion et une communication entre les cellules endothéliales et les cellules mésenchymateuses qui expriment elles aussi la N-cadhérines. Au niveau de la BHE, la N-cadhérine permet une interaction entre cellules endothéliales et péricytes ou astrocytes, importante pour l'élongation des bourgeons vasculaires et la protection des cellules endothéliales contre l'apoptose. Il est important de noter que les souris KO pour N-cadhérine meurent au stade embryonnaire et présentent les mêmes défauts vasculaires que le KO VE-cadhérine (Bazzoni, G., *et al. - 2004,* Dejana, E., *et al. - 2008,* Rudini, N., *et al. - 2008*).

C.1.1.2 Caténines

La queue cytoplasmique de la VE-cadhérine est identique pour toutes les cadhérines classiques. Elle interagit avec de nombreuses protéines intracellulaires dont les plus importantes sont les **caténines** (du grec « catenin » qui signifie lier, nom donné après la découverte de leur interaction avec l'actine). Cependant, il s'avère que leur fonction est bien plus complexe.
Quatre caténines majeures interviennent dans la dynamique des AJs : **β-caténine**, **plakoglobine** appelé aussi **γ-caténine**, **p120ctn** et enfin l'**α-caténine**. La partie COOH ter de la VE-cadhérine

est capable de lier la β-caténine mais aussi la plakoglobine L'α-caténine, homologue de la vinculine, connecte la β-caténine et la plakoglobine à l'actine (Figure 49) (Bazzoni, G., *et al. - 2004*).

La liaison de la **β-caténine** aux cadhérines est cruciale pour le contrôle de la perméabilité. En effet, une mutation au niveau de la séquence nécessaire à l'interaction provoque une diminution de la force des jonctions. De plus, le KO pour la β-caténine est létal et présente une fragilité vasculaire (Cattelino, A., *et al. - 2003*). La β-caténine libre est une étape critique dans la régulation des gènes et notamment la voie Wnt : lorsque la voie Wnt est activée la β-caténine libre est transloquée dans le noyau et régule la transcription de nombreux gènes. A l'inverse, lors d'une inactivation de la voie Wnt, la β-caténine est alors ubiquitinée et dégradée par le protéasome (Brembeck, F. H., *et al. - 2006*)(Figure 49).

La **p120ctn** se lie aux cadhérines et prévient leur dégradation. Cette protéine peut être transloquée au noyau et jouer le rôle d'un répresseur de transcription en se liant au facteur de transcription Kaso (Bazzoni, G., *et al. - 2004,* Dejana, E. - *2004,* Rudini, N., *et al. - 2008*) (Figure 49).

La **plakoglobine** est un homologue de la β-caténine et lie la même région de la cadhérine. Elle est surtout présente dans les desmosomes et possède une activité dans la régulation de la transcription. Chez les KO β-caténine, on observe un réarrangement des AJs, avec des plakoglobines en substitution de β-caténine (Bazzoni, G., *et al. - 2004,* Dejana, E. - *2004,* Rudini, N., *et al. - 2008*) (Figure 49).

L'α-caténine est un régulateur dynamique de l'actine permettant de lier les cadhérines au filament d'actine par une interaction via les β-caténines. D'autres protéines capables de lier l'actine ont été retrouvées dans les AJs comme la vinculine, l'α-actinine, la formine-1 (Bazzoni, G., *et al. - 2004,* Dejana, E. - *2004,* Rudini, N., *et al. - 2008*) (Figure 49).

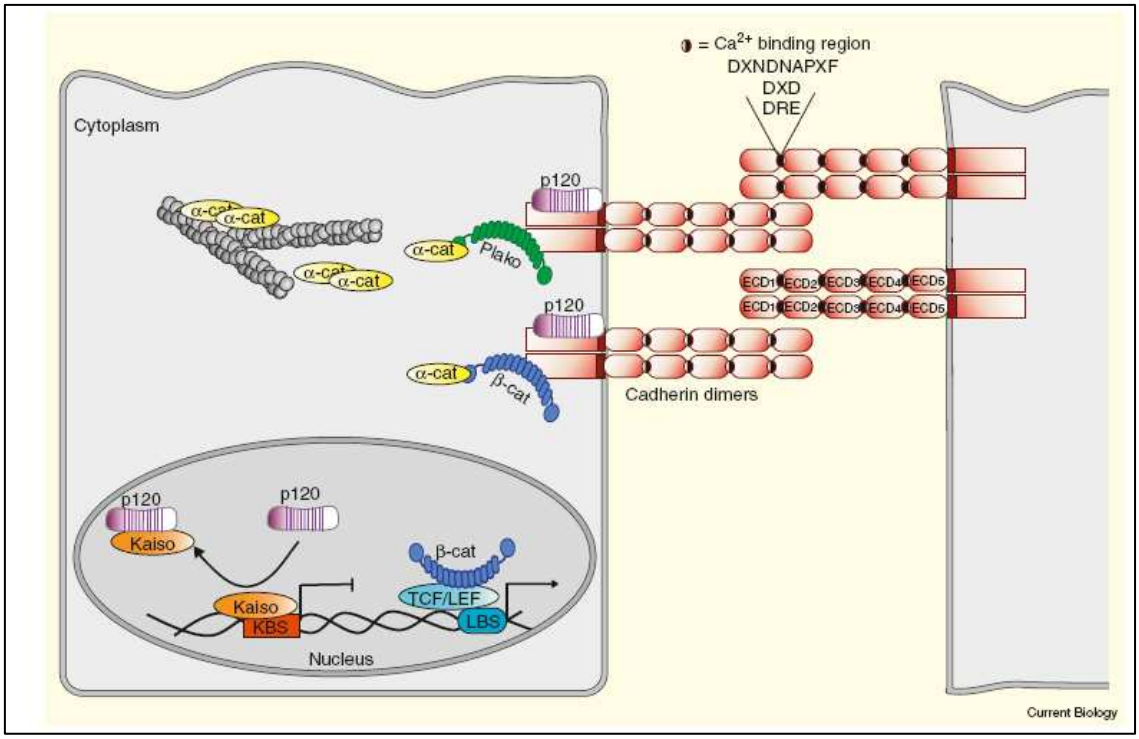


Figure 49 *: Complexe protéique cadhérines/caténines au niveau des jonctions adhérentes*

D'après (Rudini, N., et al. - 2008)

C.1.2 Le complexe Nectine/Afadine

Ce complexe a été décrit dans les cellules épithéliales et dans les cellules endothéliales, mais son rôle fonctionnel est très peu connu. Il est composé de trois protéines : nectine, afadine et ponsine.

Les **nectines** font partie d'une famille de molécules d'adhérence indépendantes du calcium comprenant 4 membres : Nectine-1, 2, 3 et 4. Les nectines contiennent un domaine extracellulaire possédant des domaines IgG-like, un segment transmembranaire et une queue cytoplasmique où se lient de nombreuses protéines dont l'afadine (Figure 50-A).

L'**afadine** est une molécule d'échafaudage qui, par son domaine PDZ, se lie aux nectines. Elle possède des multi-domaines et plusieurs variants d'épissage au niveau de la queue C-ter, l'afadine correspondant à la forme longue (Figure 50-B). Le produit du gène AF-6 est similaire à l'afadine. et lie la F-actine.

Le complexe nectine/afadine colocalise avec les cadhérines et serait impliqué dans l'initiation de la formation des AJs (Bazzoni, G., *et al. - 2004,* Takai, Y., *et al. - 2008*).

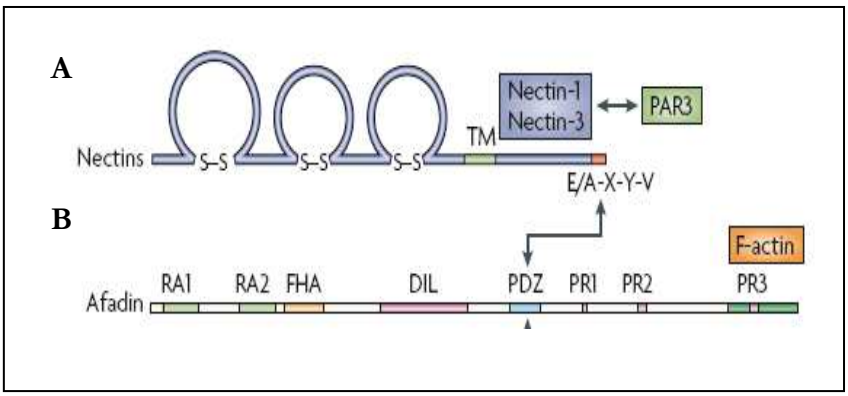


Figure 50 *: Structure du complexe nectine/Afadine*
D'après (Takai, Y., et al. - 2008)

C.2 Jonctions serrées (TJs)

Les jonctions serrées sont présentes sur seulement sur 1/5 des cellules, notamment au niveau des cellules épithéliales. Au niveau de la BHE ces jonctions sont beaucoup plus complexes et essentielles pour le maintien de l'intégrité de la barrière.

Les TJs sont reconnues comme des complexes multiprotéiques intervenant dans de nombreux processus cellulaires : prolifération, différentiation et polarité cellulaire (Van Itallie, C. M., *et al. - 2006*). Une autre grande fonction des TJs est le contrôle du flux paracellulaire par le maintien de l'intégrité de ces complexes qui permettent le passage d'ions et de petits solutés (Ebnet, K. - *2008,* Tsukita, S., *et al. - 2001*).

Le complexe protéique contient à la fois des protéines transmembranaires assurant le contact entre les cellules et des protéines cytoplasmiques associées à des protéines membranaires formant ce que l'on appelle une **plaque cytoplasmique**. Certaines de ces protéines cytoplasmiques sont des adaptateurs qui lient les protéines membranaires au cytosquelette permettant une stabilisation des jonctions serrées. D'autres jouent un rôle dans la transcription de facteurs ou encore la polarité cellulaire. C'est pour ces raisons que les TJs sont souvent associées à une **plateforme de signalisation** (Shin, K., *et al. - 2006*) (Figure 51).

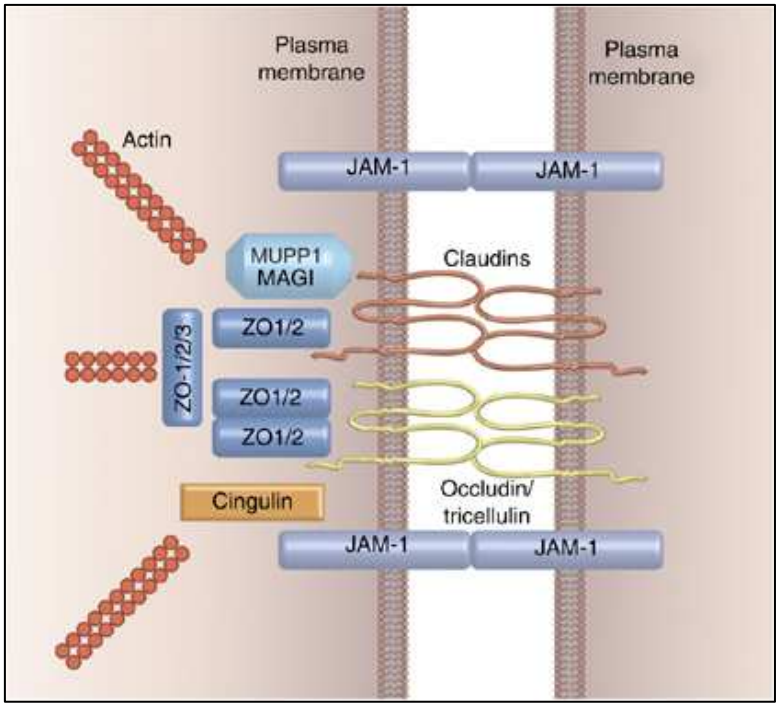


***Figure 51**: Le complexe des jonctions serrées*

D'après (Niessen, C. M. - 2007)

C.2.1 Protéines membranaires

C.2.1.1 Occludine

Structure et fonctions

L'occludine a été identifiée dans le foie de poulet et fut la première protéine transmembranaire découverte en 1993.

L'occludine est une protéine d'environ 60 kD, composée de 4 domaines transmembranaires, 2 boucles extracellulaires séparées par une petite boucle extracellulaire, une longue queue Cter et une courte extrémité NH2 (Furuse, M., *et al. - 1994*). Les boucles extracellulaires ont une composition riche en tyrosine, glycine et très peu d'acides aminés chargés, ce qui fait de l'occludine une protéine neutre (Figure 52) (Bazzoni, G., *et al. - 2004*).

Il existe une autre isoforme de l'occludine, l'occludine 1B, produit d'un épissage alternatif et contenant une insertion de 56 acides aminés. Les différences dans la fonction et la distribution de ces 2 protéines ne sont pas encore connues (Muresan, Z., *et al. - 2000*).

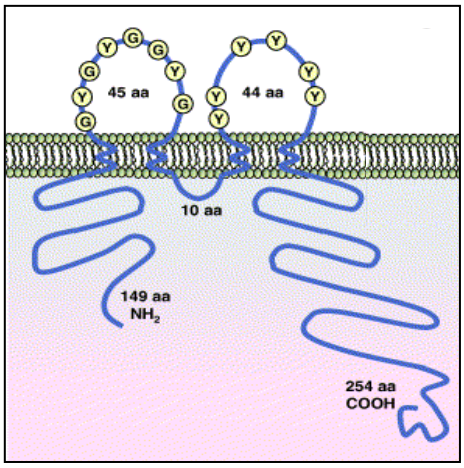


Figure 52 *: Structure de l'occludine*
D'après (Gonzalez-Mariscal, L., et al. - 2003)

L'occludine joue un rôle important dans le maintien des jonctions, par l'interaction cellules-cellules via les boucles extracellulaires. L'extrémité Nter a un rôle important dans le maintien de l'assemblage des TJs et participe à la **migration des neutrophiles** (Huber, J. D., *et al. - 2001*)**.** L'extrémité C ter cytosolique est composée d'un grand nombre de résidus thréonine, tyrosine et sérine, cibles de nombreuses phosphatases et kinases. Elle régule la perméabilité de la BHE et surtout la **transduction du signal intracellulaire,** fonctions principales des occludines. En effet les souris occludine -/- ne présentent pas d'anomalies au niveau des barrières ; cependant elles développent différents phénotypes : retard mental, stérilité des mâles, anomalies de l'épithélium gastrique, suggérant le rôle de cette protéine dans la signalisation intracellulaire (Niessen, C. M. - *2007*).

L'occludine est impliquée dans l'activation de la GTPase RhoA, donc contrôle le cytosquelette. D'autre part, elle interagit avec TGF-β1 et permet sa localisation au niveau des jonctions serrées favorisant la rupture des TJs suite à son activation. De plus, cette protéine participe à l'activation des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose : MAPkinase ou Akt (Schneeberger, E. E., *et al. - 2004,* Shin, K., *et al. - 2006,* Wolburg, H., *et al. - 2002*).

Modulation de l'expression

La transcription de l'occludine est régulée par un grand nombre de facteurs incluant la voie RAS, les cytokines inflammatoires (TNFα ou IFNγ), révélant une régulation importante de cette protéine en conditions physiologiques et pathologiques (Schneeberger, E. E., *et al. - 2004*).

C.2.1.2 Claudines

Structure

L'effet non attendu de la souris KO pour l'occludine au niveau de la barrière a mené l'équipe de Tsukita à identifier d'autres protéines des TJs. Ils ont alors mis en évidence 2 protéines de 20 kD identifiées comme claudine-1 et 2 (du latin « claudere » fermer) (Furuse, M., *et al. - 1998*). Aujourd'hui la famille des claudines s'est étendue à 24 membres. Tous les membres de cette famille ont un poids compris entre 20-27 kD et possèdent des distributions spécifiques.

Les claudines possèdent 4 domaines transmembranaires, 2 boucles extracellulaires, une extrémité Nter très courte et Cter, toutes 2 cytoplasmiques. Les boucles extracellulaires contiennent de nombreuses charges dont certaines sont conservées dans les différentes isoformes des claudines (Figure 52). Cependant l'extrémité COOH montre une grande hétérogénéité dans les différentes isoformes. Malgré des ressemblances topologiques avec les occludines aucune homologie de séquences entre ces 2 protéines n'a été trouvée. (Gonzalez-Mariscal, L., *et al. - 2003,* Schneeberger, E. E., *et al. - 2004,* Wolburg, H., *et al. - 2002*)

Chaque type cellulaire exprime au moins 2 claudines différentes. On retrouve plus particulièrement la claudine-5 et la claudine-1 au niveau des cellules endothéliales et les claudine-3, 5 et 12 au niveau de la BHE alors que la présence de la claudine-1 reste encore controversée (Zlokovic, B. V. - *2008*).

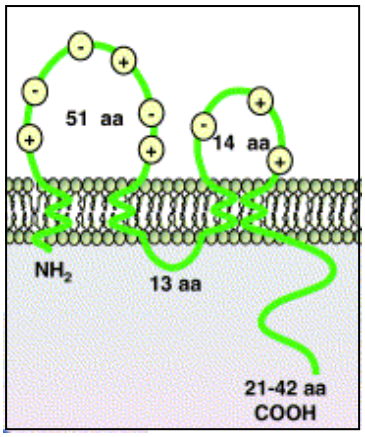


***Figure 53** : Structure des claudines*

D'après (Gonzalez-Mariscal, L., et al. - 2003)

Comme les occludines, les claudines possèdent des rôles spécifiques. Les rôles des claudines ont été étudiés par transgenèse et enfin dans les maladies humaines où une mutation des claudines a été trouvée. Du fait de leur nombre et de leurs charges, les claudines jouent un rôle dans les propriétés des barrières, notamment la **sélectivité du transport paracellulaire**. La boucle cellulaire la plus large détermine les propriétés de sélectivité. En effet, les claudines 1,4, 5, 8, 11 et 14 forment une barrière aux cations alors que les claudines 2, 10 et 15 permettent leur passage. De

façon intéressante, la diminution de la perméabilité aux cations provoque une **augmentation de la résistance électrique**. La composition en claudines des tissus détermine donc à la fois la résistance transendothéliale mais aussi la sélectivité du transport paracellulaire (Angelow, S., *et al. - 2008*).

Modulation de l'expression

La régulation de l'expression des claudines, comme celle des occludines, est actuellement très étudiée. Récemment, le promoteur murin de la claudine-5 a été cloné. La séquence de ce promoteur ne contient aucune séquence TATA box. Plusieurs sites de liaison de facteurs de transcription ont été identifiés notamment GRE (*glucocorticoid response element*), sp2, sp3, NFkB (Burek, M., *et al. - 2009*) (Figure 54).

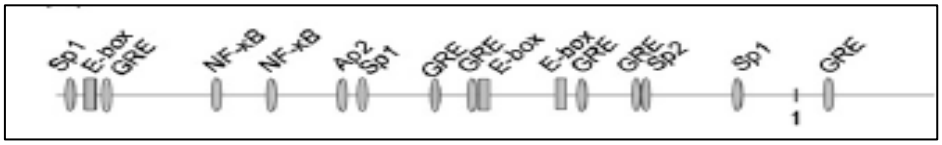


Figure 54 *: Promoteur de la claudine-5*

D'après (Burek, M., et al. - 2009)

Les E-box permettent la liaison directe du facteur de transcription Snail, impliqué dans la transition épithélium-mésenchyme retrouvée lors du développement embryonnaire, dans la réparation post-ischémique ou encore dans les processus tumorigènes. La liaison de ce facteur de transcription réprime la transcription.

On a aussi rapporté une régulation par les facteurs de croissance HGF et EGF : EGF induit une augmentation des claudines 1, 3 et 4 et une diminution de la claudine-2. Cette régulation d'expression passe par la voie des MAPkinases, notamment via ERK1/2. (Angelow, S., *et al. - 2008*)

C.2.1.3 Junctional adhesion molecules (JAMs)

Structure et fonction:

Les JAMs sont des protéines glycosylées de 45 kD faisant partie de la superfamille des IgG. On distingue 3 domaines : un domaine extracellulaire possédant 2 domaines IgG-like, un seul domaine transmembranaire et une extrémité Cter cytoplasmique contenant des domaines PDZ (Figure 55). Les JAMs sont présentes sur plusieurs types cellulaires incluant les leucocytes, les cellules endothéliales et les plaquettes (Shin, K., *et al. - 2006*).

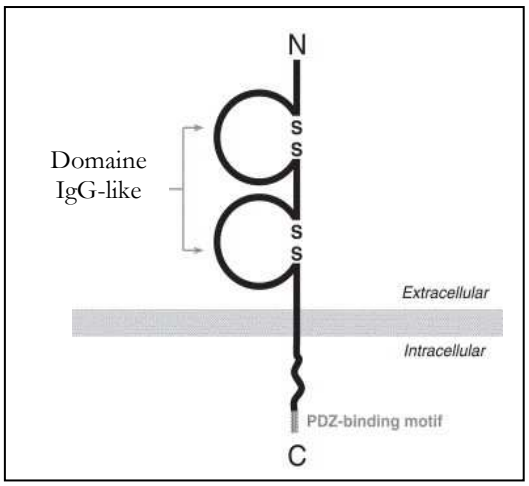


Figure 55 *: Structure des JAMs*
D'après (Mandell, K. J., et al. - 2005)

Il existe 3 membres importants dans la famille JAMs: JAM A, B, C. JAM-A et JAM-C ont une large distribution et sont localisées au niveau des jonctions des cellules endothéliales et épithéliales. Cependant ces protéines sont présentes aussi sur les cellules immunitaires telles que les neutrophiles, lymphocytes ou macrophages. JAM-B a une distribution plus restreinte au niveau des cellules endothéliales.

Les interactions homophiliques et hétéropholiques du domaine extracellulaire confèrent des fonctions spéciales. Seuls JAM-A et C sont capables de former des interactions homophiliques qui permettent la stabilisation des jonctions, réduisant la perméabilité des barrières. Les interactions hétérophiliques avec les intégrines des leucocytes notamment participent à l'extravasion des leucocytes. On peut noter aussi un rôle de JAM-A dans l'adhésion des plaquettes au niveau des cellules endothéliales (Bazzoni, G. - *2003,* Wolburg, H., *et al. - 2002*).

C.2.2 Complexes protéiques associés

C.2.2.1 Les protéines de la famille MAGUK

C.2.2.1.1 Zonula occludens

Structure

Les protéines zonula occludens sont les molécules intracellulaires des TJs les plus étudiées. Elles comptent ZO-1, la première identifiée, ZO-2 et ZO-3. Ces protéines font partie de la famille des MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*), protéines localisées dans des régions cellulaires spécifiques comme les jonctions ou les synapses. Elles possèdent spécifiquement un domaine

SH3 (*src oncogen homology domain*), un domaine et un ou plusieurs domaines PDZ. Les domaines GUK sont impliqués dans la liaison de GMP alors que le domaine SH3 est impliqué dans l'assemblage des protéines (Shin, K., *et al. - 2006*).

ZO1 est une protéine de 225 kD, présente dans plusieurs types cellulaires, mais sa distribution est variable selon le type cellulaire. Son domaine NH2 ter contient 3 domaines PDZ, une région SH3, un domaine GUK suivi d'une séquence riche en proline (Figure 56).
Il existe 2 variants d'épissage alternatif avec insertion de 80 acides aminés dont le motif est appelé α : ZO-1α+ est retrouvé dans toutes les cellules épithéliales alors que ZO-1α- est majoritairement présent dans les cellules endothéliales. L'isoforme ZO-1α- permet une plasticité plus grande des jonctions (Bazzoni, G., *et al. - 2004,* Willott, E., *et al. - 1992*).

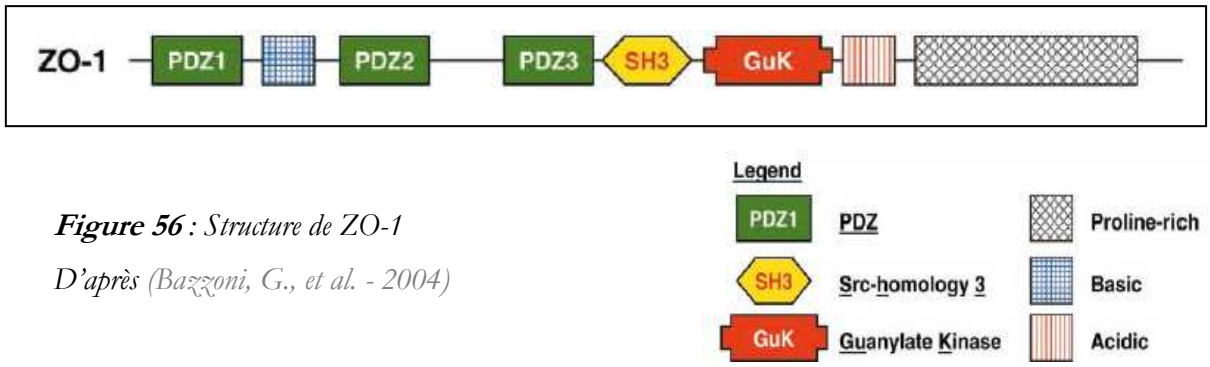
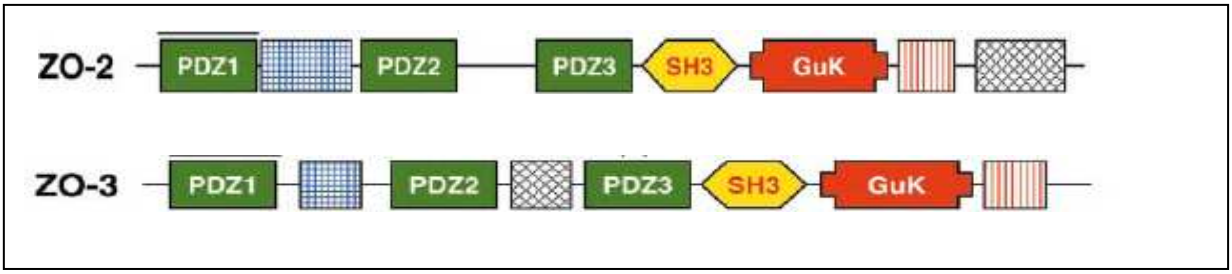


***Figure 56** : Structure de ZO-1*
D'après (Bazzoni, G., et al. - 2004)

ZO-2 et ZO-3 partagent des homologies de séquence et d'organisation des domaines avec ZO-1 (Figure 57). ZO-2 est un polypeptide de 160kD pouvant contenir un motif β suite d'un épissage alternatif d'un segment de 32 AA. On retrouve plutôt ZO-2 au niveau des jonctions adhérentes des cellules non épithéliales.
ZO-3 est une protéine de 130 kD dont la séquence riche en proline est localisée entre le second et le troisième domaine PDZ contrairement à ZO-1 et ZO-2. L'expression de ZO-3 dans les cellules mène à une déstabilisation des jonctions serrées mais a un effet global sur le cytosquelette d'actine (Bazzoni, G., *et al. - 2004*).



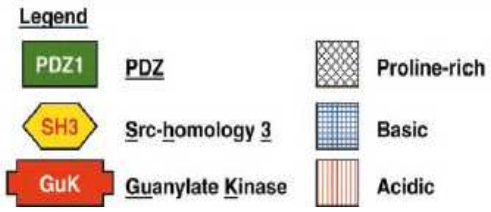


***Figure 57** : Structure de ZO-2 et 3*

D'après (Bazzoni, G., et al. - 2004)

C.2.2.1.2 Membrane-associated guanylate kinase inverted (MAGI)

Les MAGI appartiennent à la famille des MAGUK mais se distinguent par 3 différences avec les autres membres de la famille (Figure 58) :

(1) Le domaine GUK est localisé en N-ter plutôt qu'en C-ter

(2) Le domaine SH3 est remplacé par 2 domaines WW permettant une interaction protéine-protéine.

(3) Cinq domaines PDZ

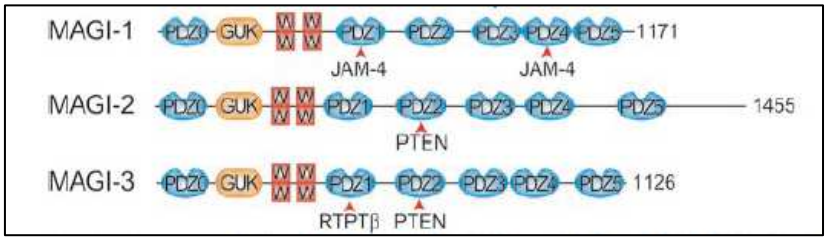


***Figure 58** : Structure des protéines MAGI.*

D'après (Schneeberger, E. E., et al. - 2004)

On dénombre 3 MAGI : 1, 2 et 3. MAGI-1 et 3 sont exprimées largement dans les tissus adultes alors que MAGI-2 est exprimée préférentiellement dans le cerveau.

Les protéines MAGIs ont plusieurs fonctions :

- Dynamique du cytosquelette d'actine
- Evènements de transduction du signal. En effet elles interagissent avec les protéines PTEN, les recrutent aux jonctions cellules-cellules et les stabilisent (Shin, K., *et al. - 2006*).

C.2.2.2 Autres protéines intracellulaires

On décrit trois autres classes de protéines intracellulaires ne faisant pas partie de la famille des MAGUK mais possédant des domaines PDZ : AF6/afadine ; PAR-3/ASIP et MUPP-1. Il existe aussi des protéines ne possédant aucun domaine PDZ (Bazzoni, G., *et al. - 2004*).

C.2.2.2.1 Protéines à domaines PDZ

AF-6 contient 3 domaines : un domaine de liaison de RAS, un domaine PDZ et un domaine myosine-V like (Figure 59). Sa localisation cellulaire reste encore controversée mais il est décrit au niveau des TJs et aussi des Jonctions adhérentes (Bazzoni, G., *et al. - 2004*).

Les protéines **PAR3 et PAR6** ont été identifiées chez C-elegans pour leur fonction dans la polarité « antérieur-postérieur ». Il s'agit des premières protéines contenant des domaines PDZ à avoir été identifiées dans cette fonction. Outre les domaines PDZ (3 pour PAR3 et 1 pour PAR6), ces protéines contiennent un domaine CRE et un domaine PB1. Nous verrons plus tard que la capacité de PAR3 et 6 à lier l'enzyme PKC est déterminant dans la mise en place de la polarité (Figure 59) (Shin, K., *et al. - 2006*).

On retrouve enfin la protéine **MUPP-1**. Cette protéine contient 13 domaines PDZ dont le 10 lie la claudine-1 et le 9 la claudine 8 et JAM1 (Figure 59). Elle est exprimée seulement au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales. Le nombre élevé de domaines PDZ suggère un rôle de protéine multivalente qui recrute un grand nombre d'autres protéines d'échafaudage. Les protéines participent à la régulation de la croissance et différentiation des cellules épithéliales (Bazzoni, G., *et al. - 2004,* Schneeberger, E. E., *et al. - 2004*).

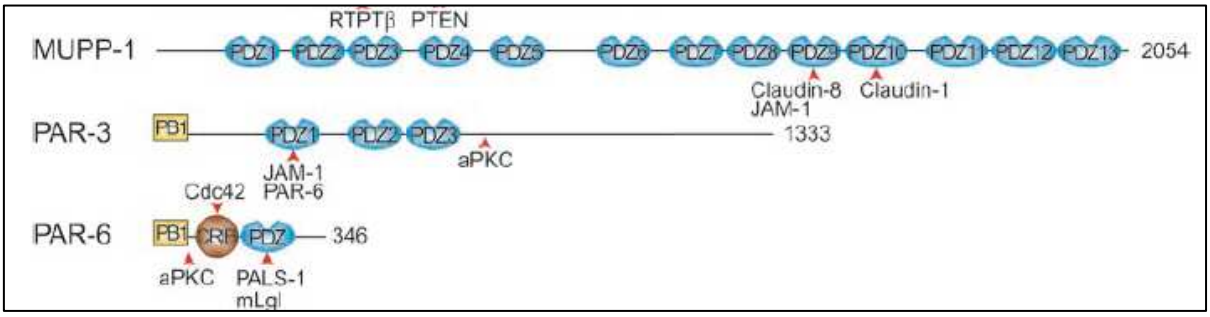


Figure 59 *: Structure des protéines MUPP-1, PAR-3 et PAR-6*

D'après (Bazzoni, G., et al. - 2004, Schneeberger, E. E., et al. - 2004)

C.2.2.2.2 Protéines sans domaines PDZ

Les **cingulines** sont des protéines de 140 à 160 kD présentes au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales et endothéliales. Elles contiennent une tête globulaire, un domaine hélice α et une extrémité COOH (Bazzoni, G., *et al. - 2004*). L'hélice α centrale est responsable de la formation d'un dimère parallèle. Elles sont exprimées très tôt dans le développement embryonnaire à la fois chez l'embryon et la mère, indiquant un rôle potentiel des cingulines dans le développement embryonnaire et la maturation épithéliale. Elles interagissent avec ZO-1, ZO-2 et ZO-3 ainsi que JAM et l'actine. De plus, des études récentes montrent un rôle important de ces protéines dans la régulation transcriptionnelle et la prolifération cellulaire, car les cingulines inhibent l'activité de Rho A nécessaire pour la progression du cycle cellulaire. Ces observations suggèrent un rôle des cingulines dans la formation des TJs par régulation de l'expression des protéines et un blocage du cycle cellulaire (Shin, K., *et al. - 2006*).

Les **simplekines** sont des protéines largement distribuées de 125 kD. Dans les cellules épithéliales et les cellules de Sertoli on les retrouve à la fois au niveau des TJs mais aussi dans le noyau. Dans les autres types cellulaires la symplekine est présente seulement dans le noyau suggérant un possible rôle dans la régulation des gènes (Bazzoni, G., *et al. - 2004*).

PLIT (*protein incorporated later into TJs*) est une protéine de 61 kD possédant un domaine riche en proline. Comme son nom l'indique cette protéine est recrutée au niveau des TJs après la formation des claudines.

JEAP (*junctions-en-riched and-associated protein*) est une protéine de 98kD contenant des séquences répétées d'acide polyglutamique, d'un domaine coiled-coil et d'une séquence consensus COOH permettant la liaison des domaines PDZ. Il est particulièrement présent dans les cellules épithéliales des glandes exocrines comme le pancréas (Bazzoni, G., *et al. - 2004*).

D. INTERACTIONS DES PROTEINES (D'après (Bazzoni, G., *et al. - 2004*, Paris, L., *et al. - 2008*)

Les protéines des TJs interagissent avec les autres protéines présentes dans les TJs mais aussi avec des enzymes comme les kinases ou phosphatases, des molécules de signalisation ou encore des protéines régulatrices (Figure 60). Ces interactions font appel aux domaines spécifiques de chaque protéine.

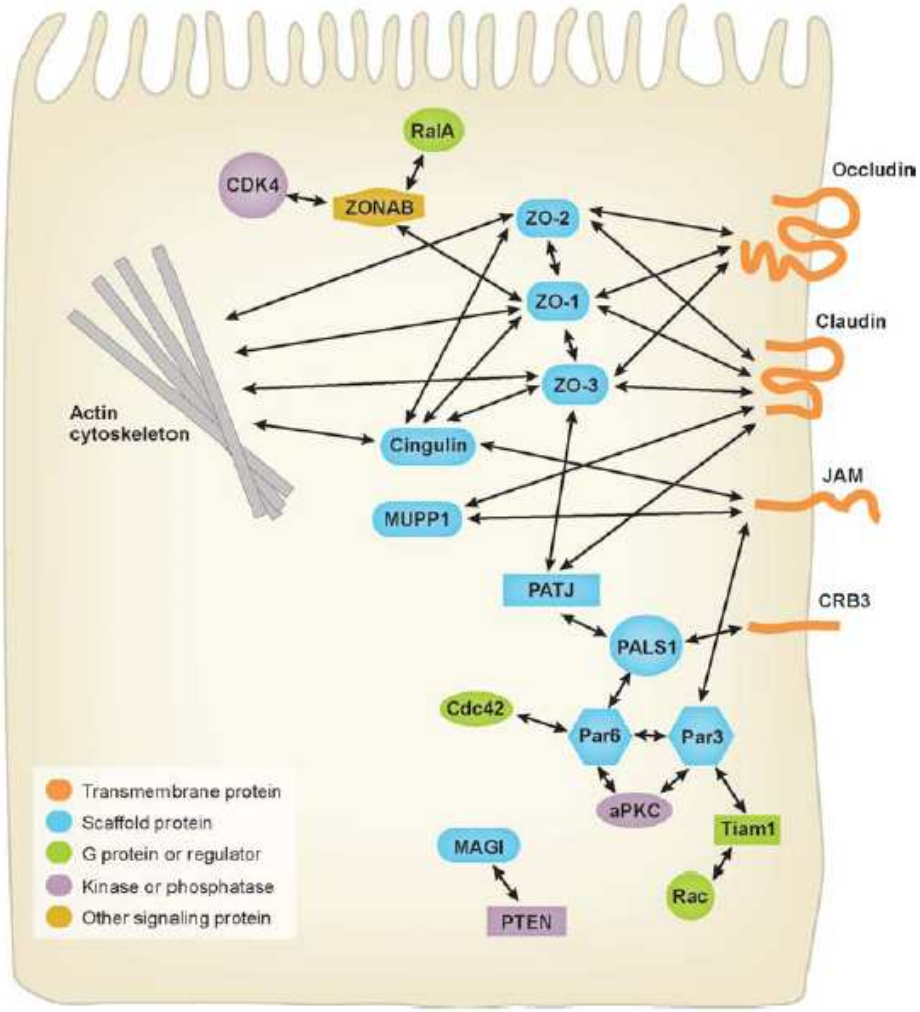


***Figure 60**: Interactions au sein des TJs*

D'après (Shin, K., et al. - 2006)

D.1 Interactions de l'Occludine (D'après (Paris, L., *et al. - 2008*)

L'occludine interagit avec l'actine via les protéines adaptatrices et notamment **zonula occludens** et les **cingulines**. La liaison entre ZO-1, ZO-2 et ZO-3 est directe et requiert le domaine GUK de ZO-1 et le domaine E de l'extrémité C-ter de l'occludine (Fanning, A. S., *et al. - 1998,* Haskins, J., *et al. - 1998*). L'interaction avec la cinguline nécessite de la même façon l'extrémité Cter (Figure 60 et 61).

Outre les protéines adaptatrices, l'occludine s'associe avec les **enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles** nécessaires durant l'assemblage des jonctions serrées comme phosphorylation, déphosphorylation et ubiquitination. Les plus importantes sont les

kinases impliqués dans la phosphorylation de l'occludine comme c-Yes, aPKC ou encore la caseine-kinase2 (Andreeva, A. Y., *et al. - 2001*). L' αPKC se lie au domaine coiled-coil de l'occludine. Pour prévenir et réguler la phosphorylation, la phosphatase 2A, est capable d'interagir avec l'occludine, réduisant ainsi le niveau de phosphorylation des sérines/thréonines qui ont un effet négatif sur l'intégrité des jonctions serrées. On retrouve aussi une interaction de l'occludine avec la sous unité régulatrice p85 de la PI3kinases. En cas de stress oxydatif l'activation de la PI3 kinase induit un rapide désassemblage des TJs (Sheth, P., *et al. - 2003*). Enfin, on retrouve une liaison de l'ubiquitine E3 ligase via l'extrémité N-ter de l'occludine permettant ainsi une ubiquitination de cette dernière menant à sa dégradation (Traweger, A., *et al. - 2002*).

L'occludine est capable de se lier à **des récepteurs,** notamment celui du TGF-β, permettant sa localisation à la membrane. L'activation du récepteur induit alors un désassemblage des TJs (Paris, L., *et al. - 2008*).

Enfin, comme beaucoup de protéines, des TJs l'occludine est capable de lier diverses **connexines**, composantes des jonctions GAP, notamment la connexine 32. Cette interaction suggère un assemblage des jonctions GAP à proximité des TJs favorisant ainsi le couplage entre l'adhésion et la communication cellulaire (Herve, J. C. - *2004*) .

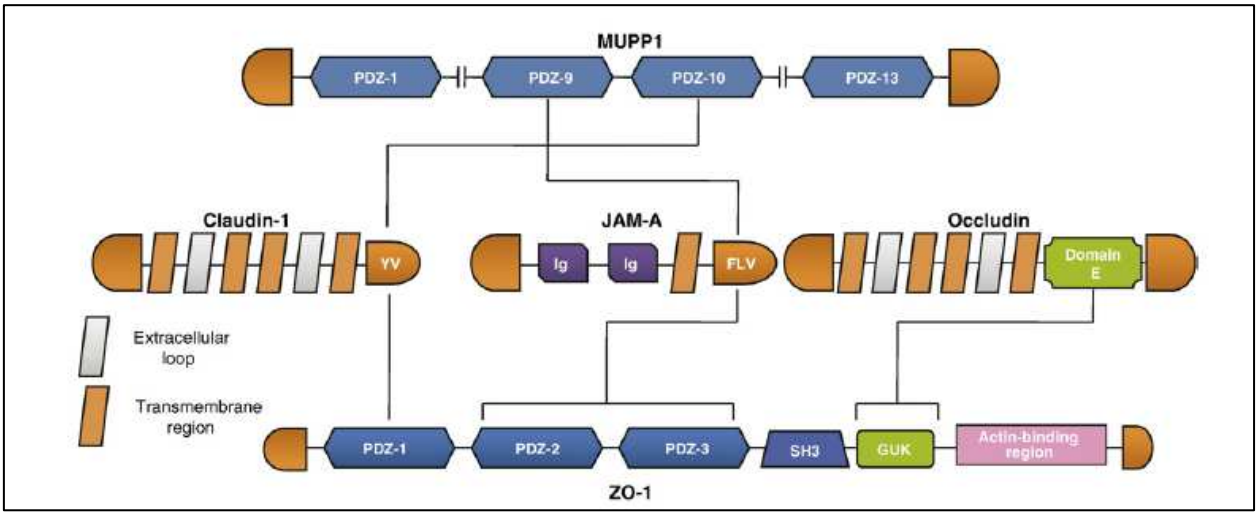


***Figure 61** : Interactions entre les protéines membranaires et les protéines adaptatrices.*

D'après (Paris, L., et al. - 2008)

D.2 Interactions des claudines

Les claudines lient des **protéines adaptatrices** et plus particulièrement zonula occludens, MUPP1 et PATJ. L'interaction se fait via le domaine PDZ1 de ZO1 et ZO2 et l'extrémité Cter des claudines 1 à 8. Le domaine Cter de la claudine 1 lie le domaine PDZ10 de MUPP1 et le domaine PDZ8 de PATJ (Itoh, M., *et al. - 1999*) (Figure 60 et 61).

Les claudines ont la capacité d'interagir avec des enzymes et plus particulièrement les **métalloprotéases (MMPs)**. En effet la claudine-1 est capable de lier MMP2 et MMP14 facilitant la localisation des enzymes à la membrane et augmentant leur activation (Miyamori, H., *et al. - 2001*).

D.3 Interactions de zonula occludens

Une des premières propriétés des protéines Zonula Ocludens est leur capacité à interagir avec les **protéines du cytosquelette** et plus particulièrement l'actine de façon directe ou indirecte, via des protéines adaptatrices comme l'afadine ou la cinguline.
L'interaction directe entre les protéines ZO et la F-actine requiert le domaine riche en proline. La liaison avec l'actine permet la localisation de ces protéines à la membrane mais aussi la clusterisation des filaments d'actine avant la formation des TJs, indiquant l'importance de l'interaction dans toutes les étapes d'assemblage des TJs.
L'interaction indirecte de ZO-1 avec l'actine fait appel à l'afadine, la cinguline, l'α-catenine et aussi la cortactine. Pour ZO-2, l'interaction indirecte fait appel à la α catenine et la protéine 4.1 (Cordenonsi, M., *et al. - 1999,* D'atri, F., *et al. - 2001,* Pokutta, S., *et al. - 2002*) (Figure 62).

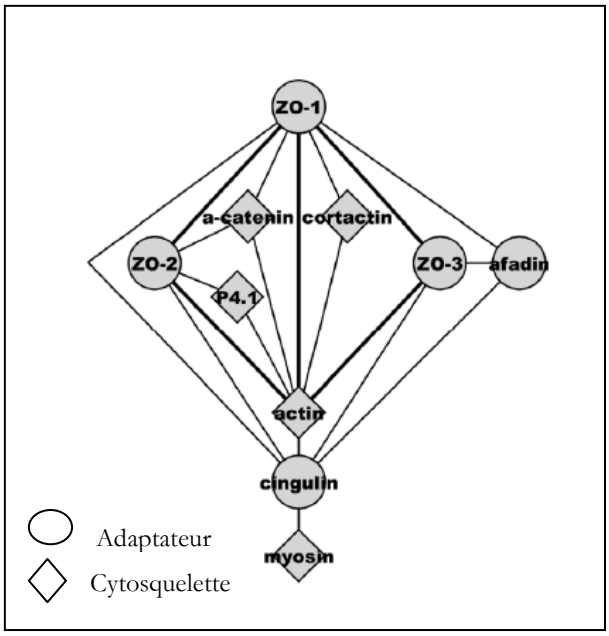


***Figure 62** : Interactions entre protéines adaptatrices et cytosquelette*

D'après (Paris, L., et al. - 2008)

Les protéines zonula occludens sont capables **d'interagir entre elles**. En effet ZO-1 peut lier à la fois ZO-2 et ZO-3 et requiert le domaine PDZ2 de chaque protéine. Cependant aucune interaction entre ZO-2 et ZO-3 n'est possible. Aucune compétition n'ayant été trouvée dans les différentes liaisons, il semble qu'il existe 2 complexes distincts ZO-1/ZO-2 et ZO-2/ZO-3 (Wittchen, E. S., *et al. - 1999*) (Figure 62).

On décrit des interactions avec les **facteurs de transcription** régulant ainsi leur activité. En effet, ZO-1 est capable de lier, via le domaine SH3 de ZO-1, ZONAB (*ZO-1-associated nucleic acid binding*) qui régule la transcription de erbB-2, co-récepteur tyrosine kinase nécessaire à la différentiation épithéliale (Balda, M. S., *et al. - 2003,* Balda, M. S., *et al. - 2000*). Cette régulation passe par une modification de la localisation sub-cellulaire de ZONAB. Lors de cellules non-confluentes aucune intéraction entre ZONAB et ZO-1 n'a lieu, permettant la translocation de ZONAB dans le noyau et de ce fait la répression de la transcription d'erbB-2. Cependant en cas de cellules confluentes ZONAB intéragit avec ZO-1 et est alors séquestré au niveau des TJs.
Comme ZO-1, ZO-2 est capable d'interagir avec les facteurs de transcription régulant le cycle cellulaire comme Jun, Fos via l'extrémité C-ter de ZO-2. Cette interaction se retrouve au niveau des TJs séquestrant le complexe Jun/Fos (Traweger, A., *et al. - 2003*) (Figure 60).

Les protéines ZO sont capables de lier des molécules impliquées dans **la signalisation.** En effet on décrit une interaction de ZO-1, via le domaine SH3, avec les kinases serine/threonine ZAK (Balda, M. S., *et al. - 1996*).

On rapporte aussi une interaction avec les **connexines.** ZO-1 est capable de lier via son domaine PDZ2, l'extrémité Cter de la connexine 43. ZO-1 et ZO-3 sont capables de lier via leur domaine PDZ la connexine 45 (Kausalya, P. J., *et al. - 2001*).

D.4 Assemblage des jonctions serrées

L'assemblage des jonctions serrées est un phénomène très complexe faisant intervenir un grand nombre de protéines et de voies de régulation et surtout la plupart des interactions que nous avons vues précédemment. Il est important de noter que l'assemblage de TJs est parallèle à la fonction de la BHE et l'augmentation de la TEER. Trois phénomènes sont importants dans l'assemblage : l'interaction des protéines, les AJs et la polarité de la cellule.

Les **AJs** jouent un rôle important dans l'assemblage précoce des jonctions. En effet, une association très rapide de ZO-1 avec la E-cadhérine et la β-caténine est rapportée lors du développement embryonnaire (Rajasekaran, A. K., *et al. - 1996*). Les étapes de compaction apparaissent rapidement et activent la E-cadhérine et les complexes de polarité. ZO-1 s'associe avec les cadhérines et JAM-1 permettant la localisation du côté apical de ces protéines. En absence d'E-cadhérine on observe un défaut d'assemblage de ces jonctions (Ohsugi, M., *et al. - 1997*). Les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés. L'hypothèse actuelle serait que cet assemblage conduit à une série d'évènements intracellulaires qui permet la réorganisation de l'actine. Un rôle important de la nectine dans l'assemblage est suggéré (Paris, L., *et al. - 2008,* Zhong, Z., *et al. - 2008*).

La **polarité des cellules** est primordiale pour l'assemblage et une fonction complète de la BHE. En effet elle limite la diffusion des protéines et des lipides et le passage des ions et des solutés. On décrit 2 complexes importants (Ebnet, K., *et al. - 2008*) :

- CRB3/PALS-1/PATJ qui permettrait un bon recrutement de PAR3, CRB jouant un rôle important dans le maintien du côté apical.
- PAR3/PARG/aPKC est très important au cours du développement embryonnaire permettant une localisation rapide de ZO-1 côté apical.

L'**interaction des protéines** est importante pour les étapes suivantes de l'assemblage. Le site primaire d'assemblage n'a pas encore été totalement élucidé, mais plusieurs hypothèses ont été

proposées, soit à l'intérieur de la cellule, soit à la membrane. On retrouve à la fois des complexes de protéines dans le cytoplasme mais aussi des clusters à la membrane, cependant l'hypothèse première semble plus probable. En effet des clusters de ZO-1 avec l'occludine et claudine-5 sont rapportés dans le cytoplasme, nécessaires pour la localisation de ces protéines à la membrane (Balda, M. S., *et al. - 2003*). Des mutations de ZO-1 affectent la localisation de ces protéines alors qu'aucune mutation de l'occludine n'affecte la localisation de ZO-1 (Saitou, M., *et al. - 1998*). Ceci démontre un rôle très important de ZO-1 dans la localisation des protéines transmembranaires, confirmé au cours du développement embryonnaire où la localisation de ces cellules apparaît à un stade plus tardif que ZO-1.

E. Perméabilité de la BHE et pathologie

E.1 Régulation de la perméabilité (D'après (Vandenbroucke, E., *et al. - 2008*)

Comme nous l'avons décrit précédemment, les astrocytes et d'autres cellules participent à aux propriétés de la BHE, via la libération de molécules diverses : facteurs trophiques, cytokines, hormones… Il est indéniable que ces facteurs extrinsèques jouent un rôle important dans l'intégrité de la barrière, notamment par l'activation des cascades de signalisation intracellulaire.
La régulation de la perméabilité passe par trois grandes étapes que nous allons détailler : l'altération de l'actine, les modifications post-traductionnelles des protéines telles que phosphorylation/déphosphorylation et enfin la dégradation de ces protéines (Gloor, S. M., *et al. - 2001*).

E.1.1 Altération de l'actine

E.1.1.1 Petites GTPases

Les **Rho GTPases** sont une famille de petites molécules de signalisation faisant partie de la superfamille des protéines Ras. Ces protéines jouent un rôle très important dans la dynamique de l'actine dont les plus étudiés sont RhoA, cdc42 et Rac1. Ces GTPases interviennent dans la régulation de la structure et des fonctions des TJs.

L'activation de **RhoA** mène à la formation de fibres de stress au niveau de l'actine, initiant la rétraction du cytosquelette et augmentant ainsi la perméabilité cellulaire. Cette activation est très rapide en réponse à des agonistes perméabilisants comme la thrombine. Rho A est capable de se

fixer à Rho-Kinase (ROCK) et de l'activer, ce qui induit la phosphorylation des protéines Ezrins, radixines et moesines (ERM) responsables de la formation des fibres de stress (Hirase, T., *et al. - 2001,* Koss, M., *et al. - 2006,* Wojciak-Stothard, B., *et al. - 2002*) (Figure 63).

A l'inverse de RhoA, les GTPases **Rac1** et **cdc42** stabilisent les jonctions (Wojciak-Stothard, B., *et al. - 2002*). Elles sont activées après la baisse d'activation de RhoA. Cette activation séquentielle suggère l'existence d'un « cross-talk » entre les GTPases (Wildenberg, G. A., *et al. - 2006*). L'effet stabilisateur de Rac1 et cdc42 passe notamment par la régulation de l'interaction entre cadhérines et caténine. Rac1 serait capable d'induire la dissociation de la β-caténine avec une autre protéine des jonctions appelées IQGAP. La β-caténine libre peut alors se lier aux cadhérines induisant la formation des AJs. Après son activation, la cdc42 est transloquée de la membrane vers le cytosol et induirait la liaison du complexe βcaténine/VE-cadhérine à l'α-caténine. De plus, Rac1 et cdc42 sont capables de rétablir les contacts cellules-cellules en stimulant l'assemblage de l'actine vers des protrusions cytoplasmiques de type lamellipodia et filopodia. Il est intéressant de noter que la cdc42 comme RhoA sont activés par la thrombine, indiquant un mécanisme de feedback positif qui reconstruit les AJs détruites (Kaibuchi, K., *et al. - 1999,* Ridley, A. J. - *1999*) (Figure 63).

L'activité des RhoGTPases est régulée par les GEFs *(guanine nucleotide exchange factors)*, les GDIs *(guanine nucleotide dissociation inhibitors)* ou encore les GAPs *(GTPases activating protein)*.
RhoGDI-1 (ou Rho-GDIα) réprime l'activation de RhoA, ce qui protége les jonctions du désassemblage. Suite à un stimulus perméabilisant, la PKC-α phosphoryle RhoGDI-1 et induit la production de fibres de stress. De plus, après stimulation par la thrombine, FAK active RhoGAP qui inhibe RhoA, permettant l'augmentation de la perméabilité contrôlée (Gorovoy, M., *et al. - 2007,* Holinstat, M., *et al. - 2006*) (Figure 63).

La fonction des RhoGTPases dans la modulation de la perméabilité est souvent rapportée dans des maladies inflammatoires. En effet le TNF-α induit la phosphorylation des ERMs via l'activation de p38 MAPkinases et de PKC, et module ainsi la F-actine. Il a aussi été montré que le LPS, protéine présente sur la membrane des bactéries, augmente l'expression de ICAM-1, molécule d'adhérence cellulaire, et active RhoA (Bazzoni, G., *et al. - 2004,* Vandenbroucke, E., *et al. - 2008*).

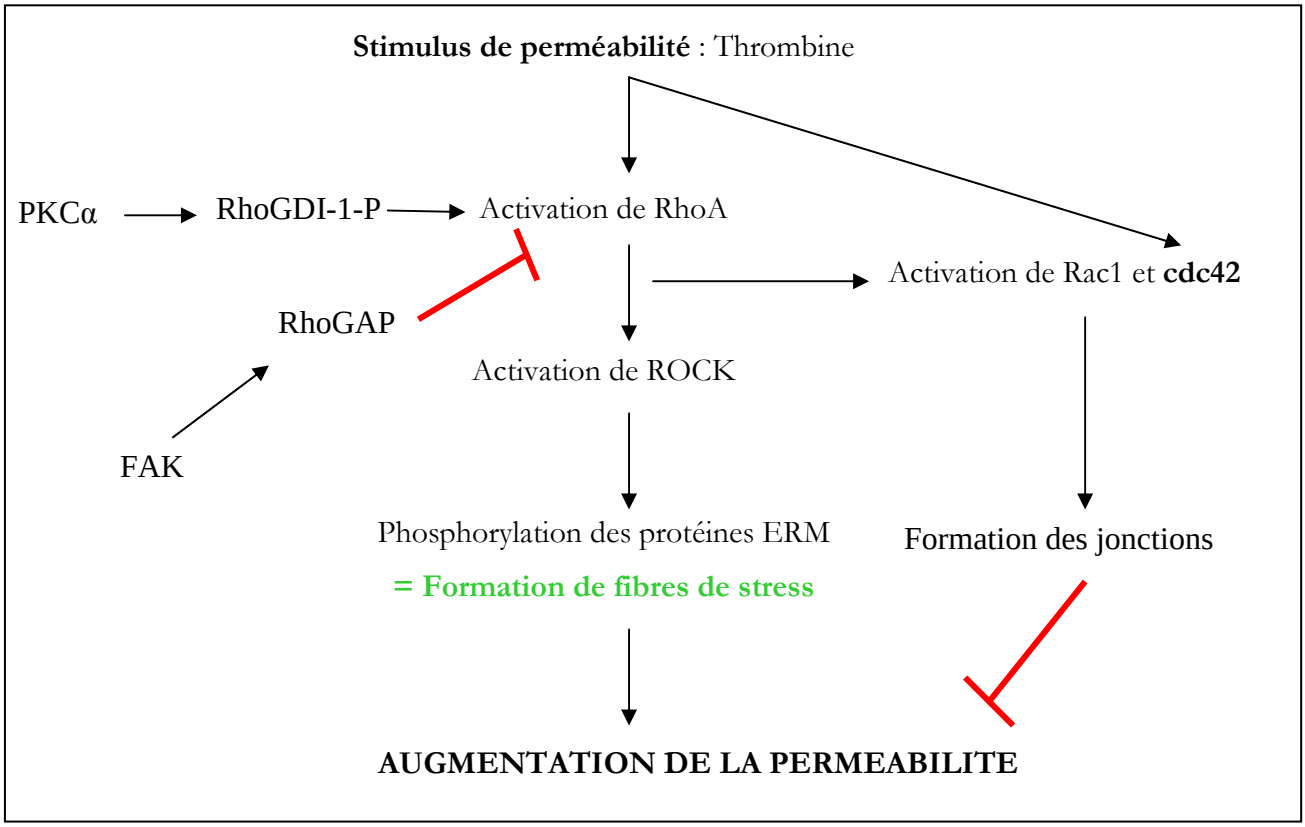


Figure 63 *: Schéma récapitulatif de la régulation de la perméabilité par les RhoGTPases*

E.1.1.2 La voie des seconds messagers

E.1.1.2.1 Le calcium

Le calcium extracellulaire et intracellulaire régule l'activité des TJs. Le calcium extracellulaire est nécessaire aux interactions homotypiques des cadhérines, notamment la E-cadhérine, initiateur dans la formation des complexes jonctionnels. Le calcium intracellulaire joue un rôle dans le contact cellule-cellule et aussi dans la migration de ZO-1 vers la membrane plasmique (Huber, J. D., *et al. - 2001*).

Un défaut dans l'homéostasie calcique induit une augmentation de la perméabilité. La concentration intracellulaire de calcium est augmentée par 2 voies (Figure 64) :

- La voie PI3kinase active le relargage des stocks de Ca2+ contenus dans le réticulum endoplasmique (RE) (Mehta, D., *et al. - 2003*).
- L'entrée du Ca2+ extracellulaire se fait par des canaux calciques : les ROC *(receptor-operated Ca2+ channels)* et les SOC *(store-operated Ca2+ channels)*. Les SOC sont activés lors de la

diminution des stocks de Ca2+ via IP2 et les ROC par le DAG (Tiruppathi, C., *et al.* - *2002*).

Le calcium peut aussi être augmenté par une augmentation de NO. Dans le cas de l'inflammation une augmentation de NO via la iNOS est présente, conduisant à l'activation d'IP3 et une augmentation de Ca2+ et de ce fait une perméabilité de la BHE (Vandenbroucke, E., *et al.* - *2008*).

La modification de la concentration du calcium cytosolique initie la contraction des cellules endothéliales et le désassemblage des jonctions.

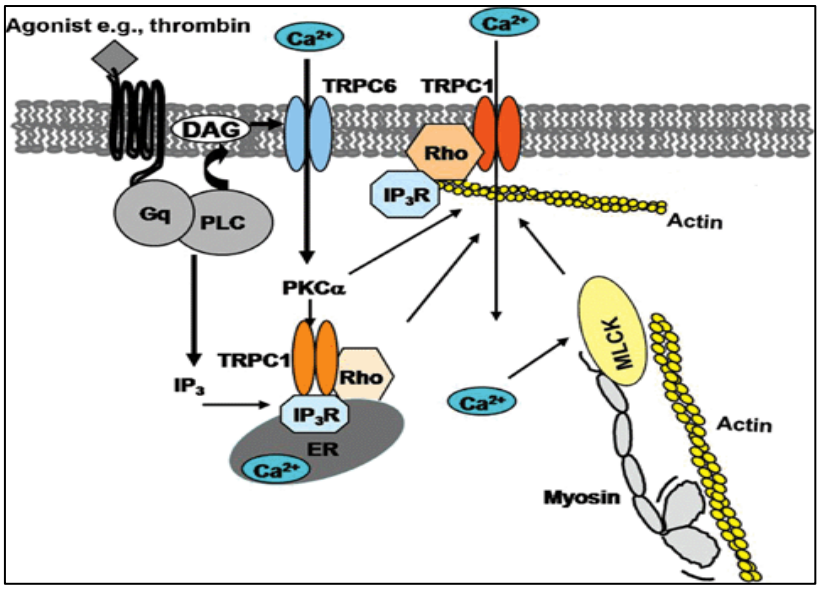


Figure 65 *: Mécanismes de l'augmentation cytosolique de calcium*

D'après (Vandenbroucke, E., et al. - 2008)

E.1.1.2.2 Rôle de l'AMPc

Les cellules endothéliales du cerveau sont très sensibles au changement de niveau d'AMPc. Une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc diminue la quantité de fibres de stress et permet le renforcement des jonctions. Cet effet est réversible lorsque la concentration en AMPc retourne à la normale et la résistance électrique diminue. La modulation de la résistance électrique par l'AMPc suggère l'existence de protéines capables d'être phosphorylées par la PKA et de contrôler la perméabilité, notamment la force des jonctions (Huber, J. D., *et al.* - *2001*).

E.1.1.2.3 Petites protéines G

Les protéines G jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la BHE définie par la résistance électrique transendothéliale. En effet, certaines protéines G sont localisées au niveau des jonctions serrées notamment Gα. L'activation de Gαi2 colocalisée avec la PKCζ au niveau des TJs est indispensable pour l'augmentation de la résistance électrique et importante pour le développement et la maintenance des TJs. Gαo accélère la biogénèse des TJs.
Le ou les récepteurs couplés à ces protéines G ainsi que la voie de signalisation modulant la fonction des TJs n'ont pas encore été identifiés. On sait seulement que l'activation des protéines G induit une augmentation de Ca2+ et de cAMP/cGMP intracellulaires dont le rôle dans la dynamique du cytosquelette a été montré ci-dessus. Au niveau des TJs, ces protéines G semblent intervenir dans l'ancrage des protéines au cytosquelette (Wolburg, H., *et al. - 2002*).

E.1.2 Modifications post-traductionnelles des protéines

E.1.2.1 Phosphorylation des TJs

La modification post-traductionnelle est importante dans l'assemblage et l'intégrité des TJs. De nombreux sites de phosphorylation, notamment au niveau des sérines, thréonines et tyrosines, sont retrouvés sur les protéines des TJs. Plusieurs kinases sont présentes au niveau des TJs, notamment 2 isoformes des PKC présente au niveau apical, la tyrosine kinase lyn (seulement présente dans les cellules endothéliales de la BHE). De même, des phosphatases (notamment la PTP) régulent l'équilibre de phosphorylation au niveau de la barrière en condition physiologique.

E.1.2.1.1 phosphorylation de l'occludine

L'**occludine** possède 3 sites importants de phosphorylation, sérine, thréonine et tyrosine, qui régulent sa localisation cellulaire, la perméabilité cellulaire et l'assemblage des TJs.
Plusieurs enzymes sont impliquées dans la phosphorylation :

Phosphorylation des sérines

- Le couple Rho/ROCK, activé par le stress oxydatif ou l'inflammation (histamine et chimiokines CCL2) mais aussi par l'éthanol, induit une augmentation de la perméabilité de la barrière par la phosphorylation au niveau des ser/thr.

- L'inhibition de la nPKCδ conduit à un blocage de la phosphorylation conduisant à la formation des TJs.
- La caséine kinase 2 (ck2) phosphoryle 2 résidus Ser/Thr hautement conservés parmi les espèces. Cependant la conséquence de cette phosphorylation sur les TJs n'est pas encore connue.

Phosphorylations des tyrosines

Une diminution de cette modification induit une localisation de l'occludine au niveau membranaire. Les forces hémodynamiques, les forces de cisaillement et l'ischémie induisent une augmentation de Tyr-P qui augmente la perméabilité. Dans le cas de l'ischémie, la phosphorylation de la Tyr est corrélée avec une augmentation de l'activité de c-src ou FAK (Gonzalez-Mariscal, L., *et al. - 2008*).

De nombreuses cytokines et facteurs de croissance induisent la phosphorylation de l'occludine. On retrouve l'Il-1β, via l'inhibition de la phosphatase PTP mais aussi l'induction de VEGF que nous traiterons plus loin.

E.1.2.1.2 Phosphorylation des protéines zonula occludens

Les protéines **zonula occludens** sont des phosphoprotéines avec un fort signal phosphosérine. L'absence de TJs au niveau de la membrane est corrélée avec une augmentation de la phosphorylation par PKC et PKA de ZO-2 et ZO-1 au niveau des sérines. Cependant, en fonction du facteur stimulant, cette phosphorylation favorise aussi la formation des TJs, (Gonzalez-Mariscal, L., *et al. - 2008*).

De nombreux facteurs sont aussi impliqués dans la phosphorylation de ZO-1 comme EGF et VEGF. Plusieurs mécanismes du système VEGF/VEGFR-2 sont proposés par Harhaj :

(1) L'activation de VEGFR-2 stimule des voies de signalisation de la famille src, impliquant la PLC-γ donc la production d'IP3 et l'activation des différentes isoformes de la PKC. En outre VEGF/VEGFR-2 stimule la PI3kinase qui active la PKC. Toutes ces voies mènent à la phosphorylation des protéines des TJs mais aussi des protéines liant l'actine comme la vinculine ou la vimentine, qui participent au démantèlement des TJs.

(2) L'activation excessive de VEGFR-2 par VEGF entraîne la phosphorylation de l'occludine et de ZO-1, qui sont ensuite internalisés par endocytose. Ces protéines internalisées sont ensuite soit dégradées soit recyclées à la membrane. Les phosphorylations pourraient modifier la

conformation de l'occludine, ce qui la rend accessible à d'autres modifications (Harhaj, N. S., *et al. - 2004*) (Figure 65).

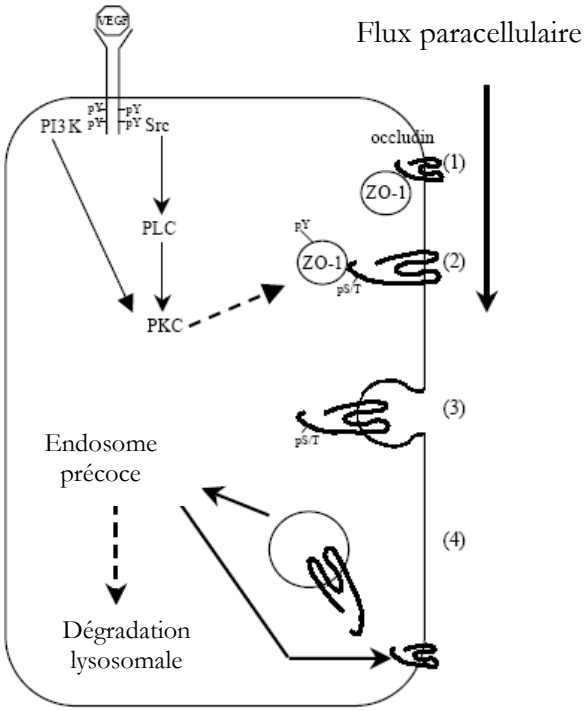


Figure 65 *: Augmentation du flux paracellulaire après phosphorylation de l'occludine et de ZO-1 en réponse au VEGF*

1. *Complexe occludine-ZO-1 à la membrane*
2. *Phosphorylation de l'occludine et ZO-1*
3. *Perte de l'intéraction occludine-ZO-1*
4. *Internalisation de l'occludine*

D'après (Harhaj, N. S., et al. - 2004)

E.1.2.1.3 Phosphorylation des claudines

Les **claudines** sont aussi les cibles de diverses kinases qui régulent le flux paracellulaire. La claudine-5 peut être phosphorylée au niveau de la Thr207 via la PKA, ce qui supprime la sélectivité du passage des molécules en fonction de la taille. Ainsi, des molécules de 150kD sont alors capables de traverser, via le flux paracellulaire, la BHE (Gonzalez-Mariscal, L., *et al. - 2008*). Il a été montré très récemment que le VEGF-A diminue l'expression de la claudine-5 et de l'occludine conduisant à une rupture de la BHE dans l'encéphalite auto-immune expérimentale (Argaw, A. T., *et al. - 2009*).

E.1.2.2 Phosphorylation des AJs

Il est maintenant accepté que les phosphorylations de la **VE-cadhérine,** notamment au niveau des tyrosines, mais aussi des autres composants des AJs, augmentent la perméabilité. Des facteurs tels que l'histamine, le TNF-α ou encore le VEGF, phosphorylent les tyrosines de la VE-cadhérine. De plus, ce niveau de phosphorylation est diminué dans le cas de cellules confluentes où les jonctions sont stables. Les kinases impliquées dans cette phosphorylation ne sont pas encore totalement connues mais les premières études désignent des tyrosines kinase ***src.*** L'augmentation de la phosphorylation au niveau des AJs implique aussi l'inhibition de phosphatases, particulièrement la VE-PTP (*vascular endothelial protein tyrosine phosphatase*) (Dejana, E., *et al. - 2008,* Rudini, N., *et al. - 2008*).

Il est important de noter qu'en fonction des stimuli, un résidu Tyr spécifique est phosphorylé. En effet, il a été montré après activation de VEGFR-2 par VEGF, que seule la Tyr 685 est phosphorylée via ***src*** ce qui induit le recrutement de la β-arrestine2 et l'endocytose de la VE-cadhérine. Elle peut ensuite être recyclée à la membrane (Figure 66) (Gavard, J., *et al. - 2006*).

Les **caténines,** telles que p120, β-caténine et la plakoglobine, peuvent aussi être phosphorylées mais les conséquences ne sont pas encore connues. Une des hypothèses suggère que la phosphorylation de la β-caténine réduirait son affinité pour la VE-cadhérine, augmentant le turnover des jonctions ((Dejana, E., *et al. - 2008,* Rudini, N., *et al. - 2008*).

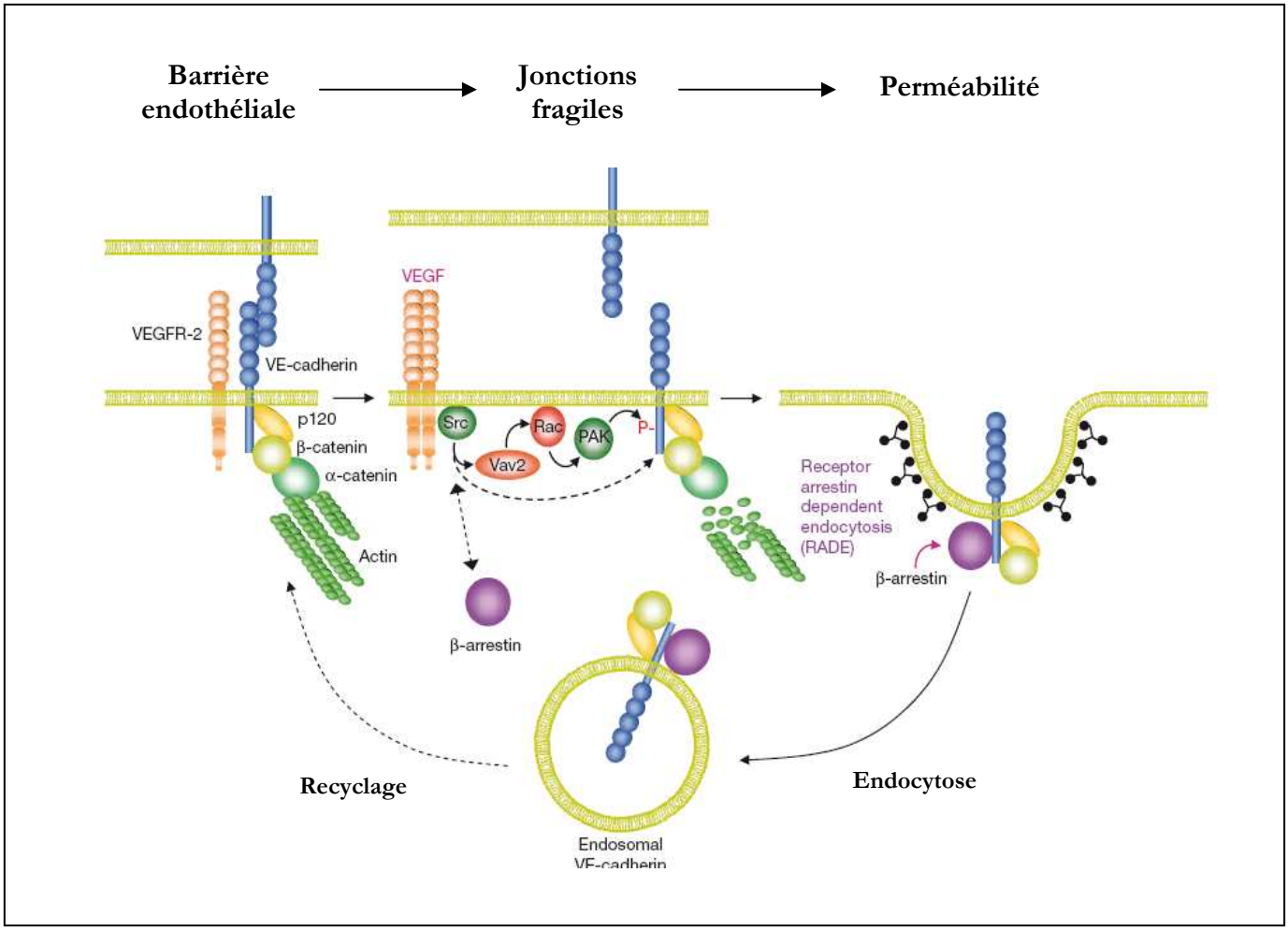


***Figure 66**: Rôle du VEGF dans la perméabilité des jonctions adhérantes.*

D'après (Gavard, J., et al. - 2006)

E.1.3 Dégradation des protéines de jonctions

La dégradation fait intervenir principalement les protéases présentes dans l'organisme et impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques. Elles sont classées en 6 groupes en fonction de leur activité catalytique. Les plus importantes dans la dégradation protéolytique des composants jonctionnels sont les métalloprotéases (MMPs) et le tissue plasminogen activator (tPA) ainsi que l'urokinase-plasminogen activator (uPA) (Rosenberg, G. A. - *2009*).

E.1.3.1 Métalloprotéinases

E.1.3.1.1 Présentation des métalloprotéases (Rosenberg, G. A. - 2009)

Les métalloprotéases (MMPs) sont sécrétées sous une forme latente, activée par de nombreux facteurs physiologiques et pathologiques. Elles induisent la perméabilité vasculaire par l'attaque de la matrice extracellulaire, la membrane basale et aussi les TJs. Au niveau de la BHE on retrouve plus particulièrement les MMP2, MMP3 et MMP9.

Les MMPs partagent une structure commune qui comprend 4 domaines : le propeptide, le catalytique, l'haemopexin-like (HP) et le transmembranaire (TMD) (Figure 67). Le passage de la forme latente à activée se fait par le clivage du domaine propeptide.
Les MMPs sont divisées en 4 sous-groupes :

- les collagénases dégradent le collagène fibrillaire présent dans le cartilage et les os.
- les gélatinases dégradent les molécules de la membrane basale, favorisant l'angiogenèse et la neurogenèse.
- les stromélysines clivent la matrice extracellulaire.
- les MMPs membranaires (MT-MMPs) dégradent la membrane basale mais aussi les jonctions serrées

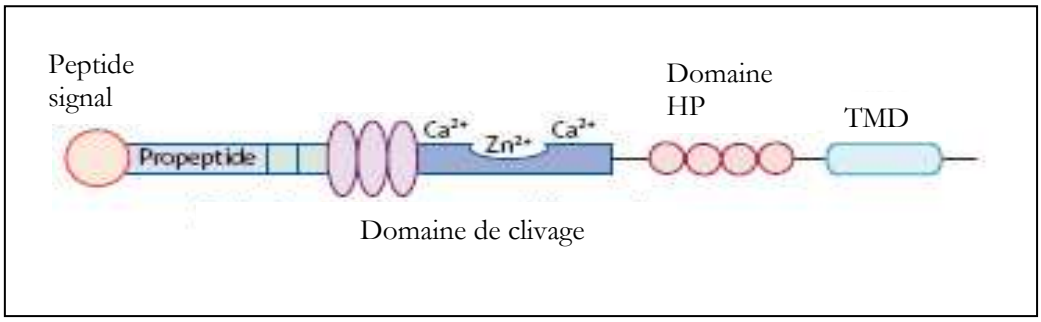


***Figure 67** : Structure des métalloprotéinases*

D'après (Rosenberg, G. A. - 2009)

Le promoteur des MMPs contient des sites de liaison pour les facteurs de transcription AP-1, NFkB, répondant aux cytokines et oncogènes qui induisent la transcription des MMPs. En effet, l'expression et l'activité des MMP2 et 9 sont augmentées en cas de stress oxydatif ou d'inflammation par la présence sur le promoteur de MMP2 de sites de fixation pour les facteurs de transcription AP-1, AP-2, Sp1 et Sp3 .

Il existe des inhibiteurs naturels des MMPs: TIMP, petites protéines de 20 à28 kD. Quatre **TIMPs** *(Tissue Inhibitor of Metalloproteinases)* ont été identifiées, dont TIMP3 qui joue un rôle central dans la croissance cellulaire, la mort cellulaire et la réparation tissulaire (Rosenberg, G. A. - *2009*).

E.1.3.1.2 Dégradation des TJs et de la matrice extracellulaire

Les MMPs dégradent à la fois la matrice extracellulaire mais aussi les TJs et Ajs, phénomène indispensable à l'angiogenèse, notamment pour la migration des cellules endothéliales.

Dégradation de la membrane basale

Les MMPs agissent dans un premier temps en clivant les intégrines αv en 2 fragments, ce qui augmente la signalisation des intégrines, donc entraîne l'adhésion cellulaire et la migration des cellules endothéliales.

On observe aussi un clivage du collagène de type IV par la MMP2, permettant la liaison αvβ3 indispensable à l'angiogenèse.

De plus, la dégradation de l'ECM libère de nombreux facteurs angiogéniques séquestrés dans la membrane : VEGF, bFGF et TGF-β, capable d'augmenter la perméabilité en modifiant les protéines des jonctions. Enfin, il a été montré dans le cas d'ischémie cérébrale, une augmentation de l'activité de MMP9 par le VEGF, ce qui amplifie les effets des MMPs. Cependant en présence d' Ang1, cette activité est significativement réduite, ainsi que la perméabilité de la BHE (Valable, S.*, et al. - 2005*).

Dégradation des protéines des jonctions

La dégradation des protéines impliquées dans **l'adhésion cellule-cellule** implique la MMP2 et 9. L'expression de ces enzymes est augmentée en cas de stress oxydatif et d'inflammation. Une fois activées, ces MMPs clivent à la fois la VE-cadhérine et les protéines des TJs (occludine et la claudine-5). Parmi les activateurs des MMPs, on trouve le TGF-β, et aussi les RhoGTPase Rac1 et cdc42, qui activent MMP9. Les voies de signalisation PKC et p38MAPkinase sont nécessaires à l'induction de l'activité de MMP9.

Les phosphatases présentes au niveau des TJs régulent l'état de phosphorylation des protéines. Dans certaines conditions, notamment inflammatoires, ces phosphatases sont inhibées, ce qui déclenche l'activation des MMPs.

Le clivage des protéines VE-cadherine, occludine et claudine-5 se fait par protéolyse de leur domaine extracellulaire, augmentant la perméabilité et l'extravasation de cellules sanguines. Actuellement, aucun clivage des autres protéines (ZO-1 ou β-caténine) n'a été démontré. La MMP2, rapidement activée, dégrade l'occludine et la claudine-5. L'inflammation active MMP3 et MMP9 présentes dans les péricytes et la microglie, et potentialisent l'effet de la MMP2 (Dejana, E., *et al. - 2008,* Gloor, S. M., *et al. - 2001,* Rosenberg, G. A. - *2009,* Rudini, N., *et al. - 2008*).

E.1.3.2 Tissue et urokinase plasminogen activators (tPA/uPA)

Le **tPA** est distribué largement dans le cerveau et contribue à la régulation et la plasticité neuronale par la dégradation de l'ECM qui est une étape nécessaire au remodelage synaptique. Il est aussi impliqué dans la dégradation des caillots sanguins. Il s'agit d'une sérine protéase provenant du sang ou secrété par les neurones. Elle permet le clivage du plasminogène en plasmine, impliquée dans la dégradation de la fibrine, composant de l'ECM. Le tPA provoque des dommages dans la membrane basale, conduisant à la rupture de la BHE et à la formation d'œdèmes. En effet, le tPA active les MMPs, plus spécifiquement la MMP9, dont les effets perméabilisant ont été décrits précédemment. De plus, la plasmine active la sérine protéase PAR-1 qui induit l'internalisation de la VE-cadherine, via l'augmentation du Ca2+ et l'activation de PKC (Adibhatla, R. M., *et al. - 2008*).

L'**uPA** se lie à son récepteur cytosolique uPAR, présent sur les cellules endothéliales, épithéliales et hématopoïétiques. L'uPA agit sur la perméabilité par 2 voies :
Une protéolyse est activée par la plasmine qui dégrade l'ECM directement ou par l'activation des MMPs.
L'uPA module l'adhésion des cellules en augmentant l'activité des intégrines via les voies src et ERK1/2. Par exemple, l'association de l'uPA avec l'intégrine α3β1 augmente la dissociation des AJs at avec l'intégrine α5β1 la production de MMP9 (Madsen, C. D., *et al. - 2008*).

E.2 Conséquences de la perméabilité

Parmi les conséquences de la rupture de BHE, on décrit une hypoperfusion, des œdèmes, parfois des hémorragies et une inflammation. Le meilleur exemple et le plus étudié est l'accident vasculaire cérébral (AVC) avec ses 2 phases : **ischémie** et **reperfusion,** pendant lesquelles apparaissent l'hypoperfusion, les œdèmes puis l'inflammation (Sandoval, K. E., *et al. - 2008*).

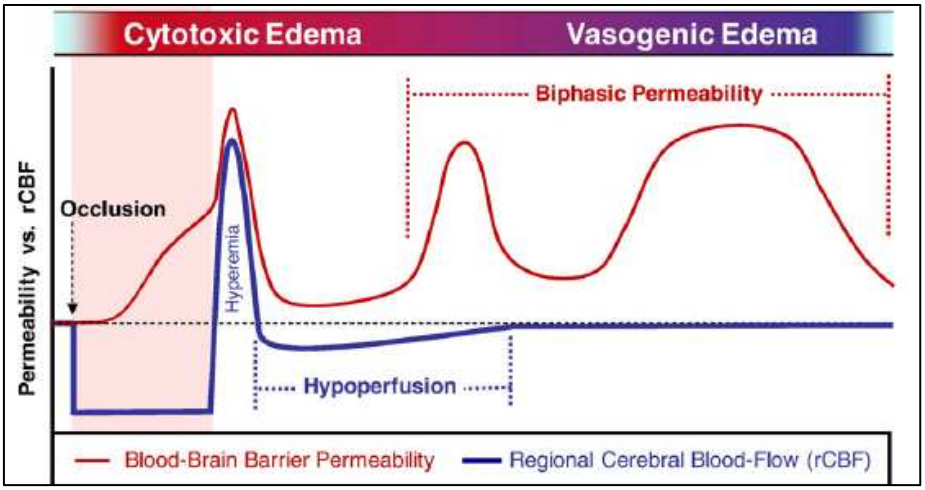


Figure 68 *: Schéma de la rupture de BHE, des variations de la perfusion et des œdèmes*

D'après (Sandoval, K. E., et al. - 2008)

E.2.1 Hypoperfusion, œdème et inflammation dans l'ischémie

E.2.1.1Hypoperfusion

La phase aigue, correspondant à l'**ischémie,** se traduit par un déséquilibre ionique, une perte de fonction métabolique, un stress oxydatif et enfin une inflammation et une hypoperfusion. Tous ces phénomènes conduisent rapidement à la rupture de la BHE par un désassemblage des jonctions cellulaires. En effet, lors de cette période, l'activation des MMPs, et du tPA dégradent l'ECM et aussi les TJs. De nombreux facteurs de croissance et notamment le VEGF ainsi que des cytokines telles que IL-1, TNF-α et MCP-1 sont sécrétés par les cellules endothéliales, astrocytes, microglie… (Valable, S., *et al. - 2005*). L'IL-1β réduit l'expression de l'occludine et de ZO-1 et induit la synthèse de VEGF et des MMPs. Le MCP-1, facteur d'attraction, redistribue les protéines occludine, ZO-1 et ZO-2 mais diminue aussi leur expression ainsi que celles de la VE-cadhérine et de la β-caténine (Dimitrijevic, O. B., *et al. - 2006,* Sandoval, K. E., *et al. - 2008*).

La rupture de la BHE provoque dans un premier temps une augmentation du débit sanguin (hyperémie) indispensable pour le tissue endommagé, mais qui, par la suite, accentue les dommages (Spengos, K., *et al. - 2006*). L'augmentation du débit sanguin augmente les forces de cisaillement qui contribuent à la perte des TJs. Cette hyperémie est suivie par une phase d'hypoperfusion, attribuée à l'obstruction micro vasculaire, par le gonflement des cellules endothéliales et des astrocytes ou encore à une dépression métabolique.

L'hypoperfusion conduit à une angiogenèse et à une augmentation des neutrophiles, qui aggravent l'inflammation. Ces deux phénomènes amplifient alors la perméabilité de la BHE (Sandoval, K. E., *et al. - 2008*) (Figure 68).

E.2.1.2 Œdèmes

Il existe deux sortes d'œdèmes : les cytotoxiques et les vasogéniques.
Les œdèmes cytotoxiques interviennent dans la phase aiguë et correspondent à une accumulation d'eau, due à une dérégulation ionique et métabolique. Ils seraient indépendants de la rupture de BHE mais participeraient à son dysfonctionnement par le gonflement des cellules endothéliales et des astrocytes qui provoquent une perte des intégrines (Del Zoppo, G. J., *et al. - 2000,* Tagaya, M., *et al. - 2001*).
Les œdèmes vasogéniques sont associés directement à une altération de la BHE en conséquence de l'angiogenèse et de l''inflammation (Sandoval, K. E., *et al. - 2008*) (Figure 68).

E.2.1.3 Inflammation

L'inflammation arrive très rapidement après une ischémie. L'activation des cellules endothéliales induit la sécrétion de plusieurs cytokines ou chimiokines, comme le MCP1 qui induit l'extravasation des monocytes et macrophages…Ces cellules recrutées dans le parenchyme amplifient l'inflammation et la perméabilité de la BHE.
D'autre part, la rupture de la BHE conduit à l'extravasation de protéines sanguines habituellement absentes du parenchyme, comme les albumines ou les protéines du complément. De la même façon que les cellules sanguines, ces protéines augmentent l'inflammation et entretiennent la perméabilité de la BHE. Ce phénomène, largement décrit dans les AVC est aussi présent dans d'autres pathologies comme les encéphalites, les maladies neurodégénératives ou l'épilepsie (Fabene, P. F., *et al. - 2007,* Sandoval, K. E., *et al. - 2008,* Zlokovic, B. V. - *2008*).

E.2.2 Perméabilité de la BHE et épilepsie

Dans les années 70, un dysfonctionnement de la BHE fut décrit pour la première fois dans l'épilepsie, comme la conséquence d'une hypertension aigue pendant les crises (Bolwig, T. G., *et al. - 1977*). Par la suite, plusieurs publications ont suggéré qu'une rupture de la BHE aggravait les crises (Remler, M. P., *et al. - 1984*).

C'est en 1986 qu'une revue a mentionné le lien important entre épilepsie et dysfonctionnement de la BHE et abordé pour la première fois le rôle des jonctions cellulaires. Mais on ne savait pas encore si ce lien était dû à un effet limitant de la BHE, par un transport trop sélectif de nutriments nécessaires pour le cerveau lors d'une crise, ou si les altérations de la BHE participaient activement à l'épilepsie (Cornford, E. M.*, et al. - 1986*).

En 1989, une autre étude souligna la différence de sensibilité selon l'âge, en comparant des des animaux de 6 à 120 jours. Soumis à des crises induites par le PTZ, les rats adultes sont plus fragiles que les jeunes (Ziylan, Y. Z.*, et al. - 1989*).

En 1990, une étude décrivit une accumulation importante de protéines du sérum dans le parenchyme, notamment l'albumine (Sokrab, T. E.*, et al. - 1990*). Malheureusement, il n'y eut pas de suite immédiate à cette étude. En 1999 plusieurs observations rapportèrent une perméabilité de la BHE dans plusieurs modèles d'épilepsie. C'est à cette époque qu'on commença à comprendre l'importance de la BHE dans l'épilepsie et même dans certains de ses aspects diagnostiques ou thérapeutiques (hypoperfusion interictale, succès de l'empirique régime cétogène, pharmacorésistance etc…) (Janigro, D. - *1999*).

Les études qui suivirent portaient sur le rôle des transporteurs de la BHE comme Glut1 (Cornford EM 1999) et surtout sur les transporteurs impliqués dans la pharmacorésistance (Abbott, N. J. - *2000,* Loscher, W.*, et al. - 2005,* Marchi, N.*, et al. - 2004,* Potschka, H.*, et al. - 2004*). Mais ces études négligèrent l'éventualité d'un effet épileptogène de la perméabilité de la BHE. Cette hypothèse fut reprise en 2007, avec 4 études (Ivens, S.*, et al. - 2007,* Marchi, N.*, et al. - 2007,* Rigau, V.*, et al. - 2007,* Van Vliet, E. A.*, et al. - 2007*). Depuis, plusieurs arguments ont prouvé un lien évident entre épileptogénèse et rupture de la BHE.

.

HYPOTHESES & OBJECTIFS

A partir de la bibliographie, nous avons tenté de relier plusieurs constats :

1- Une rupture de la BHE, accidentelle ou provoquée, induit des crises chez l'animal et aussi chez l'homme (Fabene, P. F., *et al. - 2008,* Ivens, S., *et al. - 2007,* Marchi, N., *et al. - 2007,* Ransohoff, R. M. - *2009,* Seiffert, E., *et al. - 2004*).

2- Dans l'ischémie cérébrale, il existe un lien causal entre angiogenèse et rupture de BHE, avec un rôle majeur du facteur VEGF (Zhang, Z. G., *et al. - 2000*).

3- Des crises induisent l'expression de VEGF et une sur régulation de gènes impliqués dans la signalisation de l'angiogenèse (Croll, S. D., *et al. - 2004,* Hellsten, J., *et al. - 2005,* Hunsberger, J. G., *et al. - 2005*).

Nous émettons les hypothèses suivantes :

- L'angiogenèse et l'épileptogenèse forment un cercle vicieux : les crises activent des facteurs angiogéniques qui perméabilisent la BHE, laissant passer des composants du sang qui sont épileptogènes…
- L'inhibition de facteurs angiogéniques par des molécules développées en oncologie, pourrait, en protégeant la BHE, réduire, voire supprimer, l'épileptogenèse.

Les objectifs de cette thèse concernent donc le remodelage vasculaire dans l'épilepsie, notamment les processus d'angiogenèse et de rupture ou de réparation de la BHE.

L'étude se divise en trois grands objectifs :

- Le premier est de démontrer la présence d'une néo-vascularisation dans les foyers épileptiques humains, puis dans un modèle d'épilepsie limbique chez le rongeur, permettant ainsi d'étudier la cinétique de l'angiogenèse.
- Le deuxième cible l'impact des crises et des lésions sur l'induction de la néo-vascularisation et le rôle du facteur angiogénique VEGF et de son récepteur VEGFR-2.
- Le troisième est de comparer la dégradation ou la réparation de la BHE dans divers modèles, afin d'identifier des mécanismes protecteurs qui pourraient constituer des cibles thérapeutiques.

MATÉRIELS & MÉTHODES

A. Quels modèles d'épilepsie ont été utilisés ?

A.1 Modèles *in vivo*

Quatre-vingt rats mâles Sprague–Dawley de 200–250 g (Janvier) sont anesthésiés avec 3 ml/kg d'equithesine (i.p.) et implantés avec des électrodes bipolaires dans l'hippocampe droit ou le thalamus droit et des électrodes de surface dans le cortex pariétal.

A.1.1 Modèle « chronique » : lithium-pilocarpine

Une semaine après l'implantation, tous les rats sont prétraités avec du lithium (3 meq/kg i.p.), pour potentialiser les effets de la pilocarpine, puis 18h plus tard ils reçoivent une injection de methylscopolamine bromide (1 mg/kg i.p.), pour les protéger des effets périphériques de la pilocarpine. 28 rats reçoivent une injection de pilocarpine hydrocholoride (30 mg/kg, i.p.) alors que 12 rats contrôles ont une injection de solution saline. Trente minutes après l'injection de pilocarpine, les rats développent un *status epilepticus* (SE) se traduisant sur l'EEG par des décharges continues et sur le plan comportemental par des crises partielles plus ou moins généralisées. Le SE dure plusieurs heures et est arrêté par l'injection de diazepam (2 mg/kg i.p), réduisant la sévérité des convulsions mais préservant les décharges de l'hippocampe. Les rats sont ensuite sacrifiés à différents temps selon le schéma des modèles chroniques développé dans l'introduction:
i) en période aiguë (n=7 ; 1 à 24 h post SE) ; ii) période silencieuse (n=8 ; 4 à 14 j post SE) et iii) période chronique (n= 6 ; 21 à 28 j post SE). Comme contrôles, 4 rats injectés par la solution saline sont sacrifiés à chaque temps.
Les sacrifices se font par décapitation sous anesthésie profonde (diazepam 4 mg/kg i.p.)

A.1.2 Modèle « non chronique » : Kindling au pentylenetetrazol (PTZ)

Une semaine après la chirurgie, 25 rats reçoivent une injection de PTZ (30 mg/kg, i.p.) un jour sur deux pendant 28 j et 15 rats contrôles reçoivent à la même fréquence une injection de solution saline. L'EEG est enregistré et le comportement est évalué selon des scores, décrits dans l'introduction, après chaque injection. Nous avons évalué les scores dans nos expériences comme suit : Score 1 : secousses des oreilles et de la face ; Score 2 : 1 à 20 myoclonies du corps pendant 10 min ; Score 3 : plus de 20 myoclonies en 10 min ; Score 4 : convulsions ; Score 5 : convulsions clonique et généralisées.

Cinq rats sont sacrifiés par décapitation sous anesthésie profonde à chaque stade. Le sacrifice s'effectue 24 heures après l'observation du stade attendu. Au mêmes temps, 3 rats du même âge sont sacrifiés.

A.2 Modèles *in vitro*

A.2.1 Cultures organotypiques d'hippocampe

Les cultures organotypiques d'hippocampe (COHs) sont préparées selon la méthode développée par Stoppini (Stoppini, L., *et al. - 1991*). Des hippocampes de rats Sprague-Dawley, âgés de 6 à 7 jours, sont rapidement prélevés dans des conditions aseptiques et des sections transversales de 400µm, sont obtenues avec un « un tissue chopper ». Dix tranches sont placées sur un insert (membrane poreuse Ø 30 mm), déposée dans une boite de Pétri contenant 5ml de milieu de culture, maintenue dans une étuve à 35° C et 5% de CO_2. (Figure 69).Une semaine plus tard les cultures sont transférées dans un milieu défini. Elles sont prêtes pour les expériences après 15 jours de maturation.

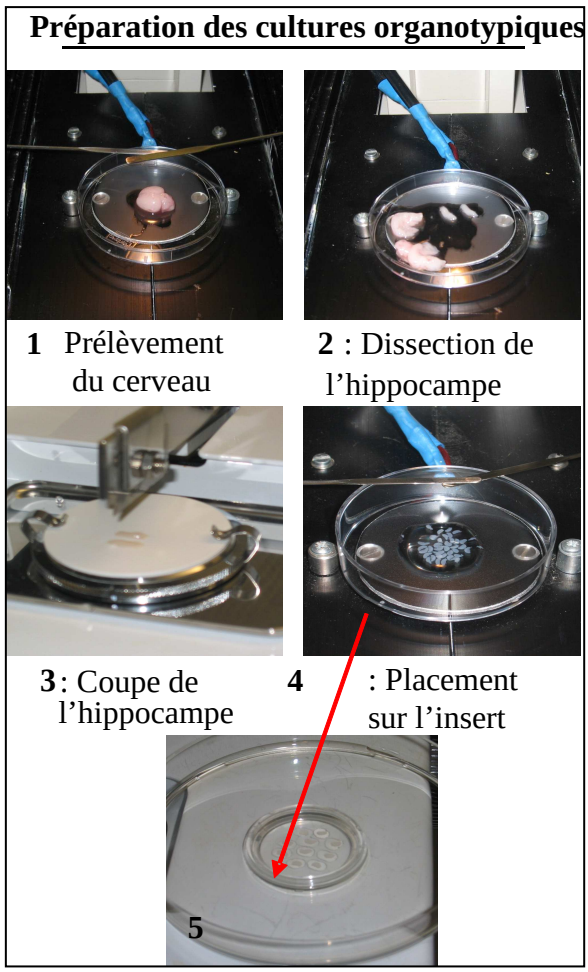


***Figure 69** : Préparation des COHs selon la méthode de Stoppini (1991)*

MILIEU DE MISE EN CULTURE	MILIEU DEFINI
Neurobasal	**Neurobasal**
25 % horse sérum inactivé par la chaleur	25% de B27
25% de HBSS	25% de HBSS
50% de Opti-MEM	50% de Opti-MEM
Penicilline 25 unités/ml ; Streptomycine 25µg/ml	Penicilline 25 unités/ml ; Streptomycine 25µg/ml

A.2.2. Induction des crises

Après deux semaines de maturation, les membranes sont transférées dans des plaques de 6 puits dont chacun contient 1 ml de milieu de culture défini. L'induction des crises se fait par addition de 25µM de kainate pendant 1h ou de 10 µM de bicuculline pendant 15 min dans le milieu de culture. Au bout d'1 heure ou de 15 min les membranes sont transférées dans une plaque 6 puits contenant le milieu de culture défini dépourvu de kainate ou bicuculline. Les cultures contrôles ne reçoivent aucune drogue mais subissent les mêmes transferts pour évaluer l'effet du stress des changements de milieu.

A.2.2.1 Validation des modèles de crises lésionnelles ou non lésionnelles

La présence de crises épileptiformes dans nos cultures a été vérifiée par **enregistrement électrophysiologique** (potentiel de champ) grâce à une micropipette positionnée au niveau des dendrites apicales de l'aire CA1. Quinze tranches sont transférées dans une interface d'enregistrement, maintenue à 30 °C et perfusées avec du milieu de culture contenant soit du kainate soit de la bicuculline pour reproduire les conditions de cultures. Les cultures contrôles ne reçoivent pas de drogues épileptogènes.

Les lésions sont évaluées par la mort cellulaire et de 2 façons différentes. La première est un test de cytotoxicité qui mesure l'activité de la lactate déhydrogénase (**LDH**), libérée dans le milieu pendant la mort cellulaire. Vingt-quatre heures après les crises le milieu de culture est prélevé et on dépose 100 µl dans 96 puits. Un mélange réactionnel est ajouté dans chaque puits pour 30 min

d'incubation à l'abri de la lumière. La densité optique (DO) est lue à 490 nm et le pourcentage de cytotoxicité est calculé par le rapport :

[(seizure DO – control DO) / (glutamate DO – control DO)] x 100

Le glutamate est considéré comme un contrôle positif de la mort cellulaire.

Nous avons utilisé en deuxième mode d'évaluation de la mort cellulaire, l'iodure de propidium (**PI**) qui permet de localiser les lésions. Le PI est ajouté au milieu de culture (7,5 µg/ml) après induction des crises. Après 24h, le milieu de culture est changé pour éliminer le PI extracellulaire et on fixe les cultures au PFA 4% pendant 30 min à 4°C.

A.2.2.2 Traitement des cultures organotypiques

Comment le rôle de VEGF dans l'angiogenèse et la rupture de la BHE a-t-il été évalué ?

Pour savoir si le VEGF était nécessaire et/ou suffisant dans ces 2 processus nous avons utilisé deux approches :

- La première est l'application de **VEGF recombinant** de rat (R&D system) dans le milieu de culture à la concentration évaluée en ELISA, soit 2000 pg/ml. Le VEGF recombinant a été appliqué dans le milieu de culture pendant 24 heures.
- La deuxième a été l'application d'un **anticorps neutralisant** l'activité du VEGF (R&D systems) dans le milieu de culture à 1µg/ml 4 heures après les crises. La stimulation a été arrêtée 24 heures après les crises. La technique d'ELISA a permis de valider la neutralisation du VEGF, en partant du principe que le VEGF déjà fixé à l'anticorps neutralisant ne pouvait pas se fixer à l'anticorps de l'ELISA.

Comment les voies de signalisation ont-elles été étudiées ?

Nous avons utilisé une approche pharmacologique par inhibition des voies :

L'inhibiteur **PP2** (*4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine*) spécifique de la voie **src**, ou l'inhibiteur **LY294002** *(2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one)* spécifique de la voie **PI3 kinase** ou le **bisindolylmaleimide** (*I 2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimide)* ou Bis 1 spécifique de **PKC** sont dilués dans du DMSO à la concentration de 10^{-2} M, 10^{-2} M et 1mM spécifiquement. Ces inhibiteurs sont ajoutés au milieu de culture **1 heure** avant l'induction des crises à la concentration de 10µM pour PP2 et LY294202 et 1µM pour Bis1. Au bout d'1 heure le kainate ou la bicuculline est rajouté au milieu. Après les crises les membranes sont transférées dans une nouvelle boite 6 puits avec 1 ml de milieu de culture et les

inhibiteurs. 5 µM de PP2 et de LY294202 ou 0,5µM de Bis1 sont rajoutés 6 à 8 heures après les crises pour éviter la dégradation de ces derniers et maintenir une concentration assez stable des inhibiteurs pendant 24 heures.

Au bout de 24 heures les cultures sont traitées pour l'immunofluorescence ou le western blot par les méthodes décrites par la suite.

B. Comment évaluer la densité vasculaire ?

Pour quantifier la densité vasculaire, nous avons utilisé la « point-couting method » déjà décrite et utilisée dans des modèles *in vivo* et les cultures organotypiques (De Paz, P., *et al. - 1985*). Cette méthode prend en compte le nombre la taille et la tortuosité des vaisseaux. Elle consiste à poser une grille de 5 x5 sur les photos numérisées et à compter chaque vaisseau croisant la grille (Figure 70).

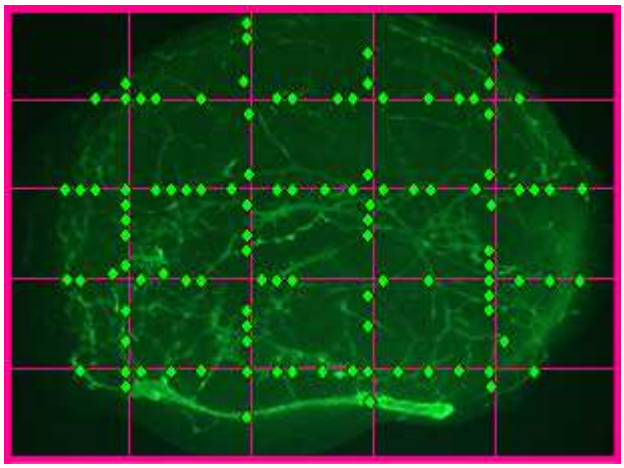


Figure 70 *: Exemple d'une grille de comptage pour les cultures organotypiques*

Pour l'**homme** la quantification s'est faite sur 3 sections de l'hippocampe (CA1/2 ; CA3/4 et GD) au grossissement x20. Les vaisseaux sont marqués à l'aide d'un anticorps dirigé contre le Von Willebrandt Facteur. La quantification des vaisseaux porte sur les 3 zones (surface totale de 0,08 mm2) et sont additionnés pour obtenir une moyenne de tout l'hippocampe.
Pour les **animaux** les vaisseaux sont marqués à l'aide du 3'3'diaminobenzidine ou DAB révélant les peroxydases des hématies. A chaque niveau : antérieur et postérieur des sections sont obtenues à un grossissement de x 5 CA1median, CA1lateral, CA3, CA4 et GD et déposé sur la

grille pour une surface totale de 1mm2. Une moyenne de l'hippocampe totale est obtenue par addition des valeurs de chacune des aires.

Pour les **cultures organotypiques**, les vaisseaux sont révélés par un marquage de la laminine (marqueur de la membrane basale des vaisseaux). Des photos de chaque culture sont obtenues à un grossissement de x 2.5. Les photos numérisées sont déposées sur la grille (surface totale de 5,2 mm2). Le nombre de vaisseaux est ramené à 1 mm2 pour l'analyse de la densité vasculaire.

C. Comment l'expression des facteurs angiogéniques a-t-elle été évaluée ?

Les facteurs angiogéniques ont été évalué à plusieurs niveaux : l'expression des transcrits (ARNm), l'expression protéique (tissulaire et sécrété) et enfin la localisation cellulaire.

C.1 Expression des transcrits

L'analyse des ARNm du VEGF et de son récepteur s'est faite par qRT-PCR au niveau des cultures organotypiques. A différents temps après les stimulations, les tranches sont placées dans une solution de RNA later permettant de stabiliser les ARNs avant l'extraction. Les ARNs totaux sont extraits par l'utilisation du kit RNAqueous-4PCR (Ambion) et leur concentration est évaluée par le Nanodrop (Thermo Scientific). 300 ng d'ARN subit une reverse transcription par le kit Cloned AMV First-Strand cDNA synthesis (Invitrogen). QPCR est effectué par la méthode de Syber Green (Applied Biosystems 7500) dans laquelle 10 ng d'ADNc sont amplifiés dans 10µl de solution contenant 1X du mix Syber avec 150 µg de chaque primer.

	Reverse (5' – 3')	**Foward (3' – 5')**
VEGF	TTGAATCCGCATGATCTGCATA	GCTATTGCCGTCCAATTGAGA
VEGFR-2	CGCTGGAGTACACGGTGGTAT	TGTCAGAGACACTGAGCATGGA
Ang-1	GATCARCATGGTTGTGGAACGT	TGCTAACAGGAGGTTGGTGGTTT
Actine	CCAGRGGRACGACCAGAGGC	CGTAGCCATCCAGGCTGTGT
TATAbox	AATCCAGGAAATAATTCTGGCTCATA	GTTGACCCACCAGCAGTTCAG
HRPT	TCGCTGATGACACAAACATGATT	TGACTATAATGAGCACTTCAGGGATT

Les résultats sont analysés par la méthode Ct dont le Ct est le nombre de cycles obtenu pour une même intensité de fluorescence, évaluée selon la courbe ci-dessous.

Figure 71 : *Exemple de courbe obtenue après qRT-PCR.*
Le trait rouge définit le seuil de fluorescence choisie pour obtenir les Ct

Ainsi une quantité peu importante d'ARNm nécessitera un nombre de cycle plus important pour obtenir une même intensité. La méthode d'analyse Ct s'effectue en plusieurs calculs :

- ΔCt = Ctgene - Ctgène de référence
- $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt stimulation – ΔCt témoin
- $2^{-\Delta\Delta Ct}$ si le résultat est égale à 1 la quantité d'ARN est identique aux conditions contrôles. Si le calcul est inférieur à 1 la quantité d'ARN est plus faible que les conditions contrôles, on peut parler de sous-régulation. Cependant si le calcul est supérieur à 1 la quantité d'ARN est plus importante.

Dans notre étude 3 gènes de référence ont été utilisés : l'actine, la TATA box et HPRT. Le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ est calculé pour chaque gène de références, les résultats représentent donc la moyenne. Les statistiques sont faites à partir de chaque delta Ct selon le test Student-t.

C.2 Expression des protéines

L'expression des protéines dans les tissus a été étudiée par la méthode classique de westerns blot. Les protéines sont extraites par pottérisation mécanique dans les tampons de lyse, résumé dans le tableau suivant. Après une série de centrifugation les protéines sont dosées par Kit BCA. Puis les protéines sont chargées sur des gels de polyacrylamide et après migration et transfert les protéines d'intérêt sont détectées par un protocole classique d'immuno-détection avec révélation par kit-ECL. Les différents anticorps utilisés sont précisés dans le tableau suivant :

	Tissu humain	**Tissu de rats**	**Culture organotypique**
Tampon de Lyse	Tris (50mM) EGTA (1mM) Sucrose (250mM) Inhibiteur de phosphatases Inhibiteur de protéases	Tris-EDTA 1X NaCl (100mM) Triton 1% Inhibiteur protéases Inhibiteur phosphatases	Tris-EDTA 1X NaCl (100mM) Triton 1% Inhibiteur protéases Inhibiteur phosphatases
Quantité de protéines chargées	50µg	40µg	40µg
Saturation (1h, TA)	Lait-TBS-t 5%	Lait-TBS-t 5%	Lait-TBS-t 5%
Anticorps primaires (ON, 4°C)	▪ **VEGF** (mouse monoclonal) 1/100 ▪ **Flk-1** (rabbit polyclonal) 1/600 ▪ **Tie2** (rabbit polyclonal) 1/600 ▪ **Actine** (mouse monoclonal) 1/1000	▪ **VEGF** (goat polyclonal) 1/100 ▪ **VEGFR-2** (rabbit polyclonal) 1/1000 ▪ **ZO-1**(rabbit polyclonal) 1/800 ▪ **Occludine** (rabbit polyclonal) 1/400 ▪ **Actine** (mouse monoclonal) 1/1000	▪ **VEGF** (goat polyclonal) 1/100 ▪ **VEGFR-2** (rabbit polyclonal) 1/1000 ▪ **ZO-1**(rabbit polyclonal) 1/800 ▪ **Occludine** (rabbit polyclonal) 1/400 ▪ **Claudin-5** (mouse polyclonal) 1/500 ▪ **Ang1** (rabbit polyclonal) 1/1000 ▪ **Ang2** (rabbit polyclonal) 1/500 ▪ **Actine** (mouse monoclonal) 1/1000
Anticorps Secondaires (1 à 2h à TA)	Goat anti-mouse 1/4000 Goat anti-rabbit 1/4000	Goat anti-mouse 1/4000 Goat anti-rabbit 1/4000 Rabbit anti-goat 1/2000	Goat anti-mouse 1/4000 Goat anti-rabbit 1/4000 Rabbit anti-goat 1/2000
Analyse	Kruskall-wallis test	Kruskall-wallis test	Kruskall-wallis test

L'analyse des westerns blot se fait à l'aide du logiciel Image J permettant de quantifier les densités optiques de chaque échantillon. Un rapport à l'actine est réalisé pour normaliser la quantité de protéines par échantillon. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux contrôles de la même condition : (DO stimulation/ DO contrôle)*100.
Le rapport Ang1/Ang2 est quant à lui calculer à partir des pourcentages obtenus.
Les différents résultats sont analysés par le test statistique Kruskall-wallis.

C.3 Sécrétion de VEGF

Nous avons étudié l'accumulation de VEGF dans le milieu de culture par la méthode classique d'ELISA, en suivant le protocole fourni par le kit (R&D system). Un anticorps anti-VEGF est rapidement « coaté » dans une plaque 96 puits à température ambiante pendant la nuit. La plaque est saturée par une solution de BSA 3% pendant 1h. Les échantillons sont ensuite incubés 2 h à TA en duplicata et en dilution de 1/10 à 1/1000. Une gamme de VEGF recombinant est aussi déposée. 2 h après, un anticorps couplé à une biotine est incubé 2 h à TA, puis la révélation se fait par incubation avec la streptavidine-HRP 20 min à TA, et un substrat colorimétrique. Après avoir arrêté la réaction avec du H_2SO4, la plaque est lue à 450 nm. Les plaques sont lavées entre chaque étape par une solution de PBS-T.

Grâce à la gamme de concentration obtenue par le VEGF recombinant, nous calculons la concentration de VEGF dans chaque puits et pour chaque dilution. Les résultats sont ensuite moyennés entre les duplicata et les dilutions et exprimé en pourcentage par rapport aux témoins et analysés par une ANOVA suivie d'un post hoc test (Fischer).

C.4 Localisation cellulaire des protéines

La localisation des protéines d'intérêt à été étudiée par des protocoles classiques d'immunofluorescence. Cependant les fixations et les méthodes d'obtention des coupes peuvent s'avérer différentes selon les marquages ou les tissus. Les différentes méthodes ont été résumées dans le tableau suivant :

C.4.1 Localisation cellulaire de VEGF

		Tissu humain	Tissu de rat	Culture organotypique
VEGF	**Fixation**	PFA-4%	PFA-4%	PFA-4%
	Coupes	Inclusion paraffine, 4µm	Vibratome, 20µm	Cryostat, 15µm
	Démasquage	Oui : chauffé 40min à 100°C dans tampon citrate à pH=6	Non	Non
	Pré-incubation ***(1h à TA et 2h pour les cultures)***	PBS, triton 0,25%, H_2O_2 1%	PBS, sérum goat et donkey 10% + Triton 0,25%	PBS, sérum goat et donkey 10% + Triton 0,25%
	Anticorps ***(12h à 4°C sauf culture 48h à 4°C dans PBS avec triton pour les cultures)***	**-Anti-VEGF** rabbit polyclonal 1/200	**- Anti-VEGF** goat polyclonal 1/100 **-Anti-GFAP** rabbit polyclonal 1/1000 **-Anti-NeuN** mouse monoclonal 1/500	**-Anti-VEGF** goat polyclonal 1/100 **-Anti-GFAP** rabbit polyclonal 1/1000 **-Anti-NeuN** mouse monoclonal 1/500 **-Anti-Laminine** mouse monoclonal 1/3000
	Révélation ***(1h à TA et 2h pour les cultures dans PBS avec triton pour les cultures)***	***Peroxydase*** - goat anti-rabbit biotinylé 1/500 - avidine-biotine DAB	***Fluorescence*** - donkey anti-goat Alexa 488 1/2000 - donkey anti-rabbit AMCA 1/100 - donkey anti-mouse Cy31/500	***Fluorescence*** - donkey anti-goat Alexa 488 1/2000 - donkey anti-rabbit AMCA 1/100 - donkey anti-mouse Cy3 1/500

C.4.2 Localisation cellulaire de VEGFR-2

		Tissu humain	Tissu de rat	Culture organotypique
VEGFR-2	**Fixation**	PFA-4%	PFA-4%	PFA-4%
	Coupes	Inclusion paraffine 4µm	Vibratome 20µm	Tranches entières
	Démasquage	Oui : chauffé 40 min 100°C dans tampon citrate pH=6	Non	Non
	Préincubation ***(1h à TA et 2h pour les cultures)***	PBS, triton 0,25% H_2O_2 1%	PBS, sérum goat et 10% + Triton 0,25%	PBS, sérum goat et donkey 10% + Triton 0,25%
	Anticorps ***(ON à 4°C sauf culture 48h à 4°C dans PBS avec triton pour les cultures)***	**-Anti-Flk-1** rabbit polyclonal 1/200	**- Anti-VEGFR-2** rabbit polyclonal 1/200 **- Lectine biotinylée** 1/200	**-Anti-VEGFR-2** rabbit polyclonal 1/200 **-Anti-GFAP** mouse monoclonal 1/500 **-Anti-NeuN** mouse monoclonal 1/500 **-Anti-Laminine** mouse monoclonal 1/3000
	Révélation ***(1h à TA et 2h pour les cultures)***	***Peroxydase*** -goat anti-rabbit biotinylé 1/500 -Avidine biotine DAB	***Fluorescence*** - goat anti-rabbit Alexa 488 1/2000 -Avidine Texas Red 1/200	***Fluorescence*** - goat anti-rabbit Alexa 488 1/2000 - donkey anti-mouse Cy3 1/500

C.4.3 Localisation cellulaire de Tie-2

		Tissu humain
Tie 2	**Fixation**	PFA-4%
	Coupes	Inclusion paraffine ; 4µm
	Démasquage	Oui : chauffé 40min à 100°C dans tampon citrate à pH=6
	Préincubation ***(1h à TA)***	PBS, triton 0,25% H_2O_2 1% goat sérum
	Anticorps ***(ON à 4°C à 4°C dans PBS)***	**- Anti-Tie2** rabbit polyclonal 1/200 **-Anti-CD31** mouse monoclonal 1/20
	Révélation	***Peroxydase*** - goat anti-rabbit biotinylé 1/500 - kit avidine-biotine - DAB + hematoxyline ***Fluorescence*** - goat anti-rabbit Alexa 488 1/200 - donkey anti-mouse - Cy3 1/500

C.4.4 Localisation des IgGs

		Tissu humain	Tissu de rat
IgGs	**Fixation**	PFA-4%	PFA-4%
	Coupes	Inclusion paraffine, 4µm	Vibratome 20µm
	Démasquage	Oui : chauffé 40min à 100°C dans tampon citrate à pH=6	Non
	Pré-incubation ***(1h à TA et 2h pour les cultures)***	PBS, triton 0,25% H_2O_2 1%	- PBS, sérum goat et donkey 10% + Triton 0,25% - PBS, triton 0,25% et H_2O_2 1%
	Anticorps ***(ON à 4°C dans PBS***	**-Anti-IgGs humaines** biotinylé 1/100 **-Anti-NeuN** mouse monoclonal 1/50	**- Anti-**IgG de rat biotinylé 1/100 **- Anti-**IgGs de rat Alexa 488 1/2000
	Révélation ***(1h à TA dans PBS***	***Peroxydase*** kit avidine-biotine et DAB et Fast red + hématoxyline	***Peroxydase*** -kit avidine-biotine DAB +hematoxyline /éosine ***Fluorescence*** -Donkey anti-mouse Cy3 1/500

C.4.5 Localisation de ZO-1

		Tissu humain	Tissu de rat	Culture organotypique
ZO-1	**Fixation**	Post fixation Methanol 5 min à 4°C	Post fixation Methanol 5 min à 4°C	PFA 4%
	Coupes	Cryostat	Cryostat (avant fixation)	Tranches entières
	Demasquage	Non	Non	Non
	Préincubation ***(1h à TA ou 2h à TA pour cultures)***	PBS, Triton 0,25%, sérum goat 10%	PBS, Triton 0,25%, sérum goat 10%	PBS, Triton 0,25%, sérum goat 10% et donkey 10%
	Anticorps ***(ON à 4°C à 4°C dans PBS ou 48h dans PBS + triton à 4°C pour cultures)***	**- Anti-ZO-1** rabbit polyclonal 1/200 **- Lectine biotinylée** 1/200	**- Anti-ZO-1** rabbit polyclonal 1/200 **- Lectine biotinylée** 1/200	**- Anti-ZO-1** rabbit polyclonal 1/200 **- Anti-Laminine** mouse 1/3000
	Révélation ***fluorescence (1h à TA dans PBS ou à TA pour les cultures)***	-Goat anti rabbit Alexa 488 1/2000 -Avidine Texas red 1/200	-Goat anti rabbit Alexa 488 1/2000 -Avidine Texas red 1/200	-Goat anti rabbit Alexa 488 1/2000 -Donkey anti-mouse Cy3 1/500

Pour les marquages d'IL-1β ainsi que les marquages d'albumine, les expériences ont été effectuées par l'équipe d'Annamaria Vezzani (Mario Negri Institute, Milan) selon le protocole décrit dans l'article Marcon et al 2009

RESULTATS

CHAPITRE I

ANGIOGENESE ET RUPTURE DE LA BHE DANS LES FOYERS EPILEPTIQUES

Cette étude est le fruit d'une observation fortuite. Dans un travail antérieur sur des tissus humains provenant de la chirurgie de l'épilepsie du lobe temporal, notre équipe a mis en évidence trois zones de neurogenèse importante : la zone sous-granulaire, la zone sous-ventriculaire et la fissure hippocampique (Crespel, A., *et al. - 2005*). L'utilisation de marqueurs de division cellulaire avait permis de déceler des cellules post-mitotiques dans des microvaisseaux de ces 3 régions, évoquant les « clusters neuro-angiogéniques » décrits dans la neurogenèse physiologique (Palmer, T. D., *et al. - 2000*). Des marqueurs de cellules endothéliales confirmèrent la présence de nombreux microvaisseaux immatures dans les foyers épileptiques, évoquant un processus d'angiogenèse pathologique.

L'idée d'un remodelage vasculaire était séduisante, car les épilepsies partielles présentent quelques particularités, comme les variations hémodynamiques, utilisées couramment en imagerie fonctionnelle pour localiser avec précision le foyer, sans être réellement expliquées. Notre équipe a donc entrepris l'étude de la vascularisation des foyers épileptiques et de la perméabilité de la BHE, ainsi qu'une recherche de facteurs angiogéniques dans des tissus humains et sur un modèle animal d'ELT.

A. Remodelage vasculaire dans l'ELT

Toutes les pièces d'exérèses de patients avec ELT montrent une densité vasculaire significativement augmentée par rapport aux patients témoins. Dans toutes les ELT avec diverses étiologies, les vaisseaux apparaissent plus longs, plus tortueux et plus nombreux que chez les patients témoins, pour toutes les régions hippocampiques, plus particulièrement dans les couches de neurones pyramidaux (CA1/CA3) et granulaires (Figure 72).

L'augmentation de la densité vasculaire est indépendante de l'âge, du sexe du patient, de la durée de la maladie, de l'étiologie de l'épilepsie et de la sévérité des lésions. Cependant, nous avons pu montrer une corrélation positive entre la densité vasculaire et la fréquence des crises.

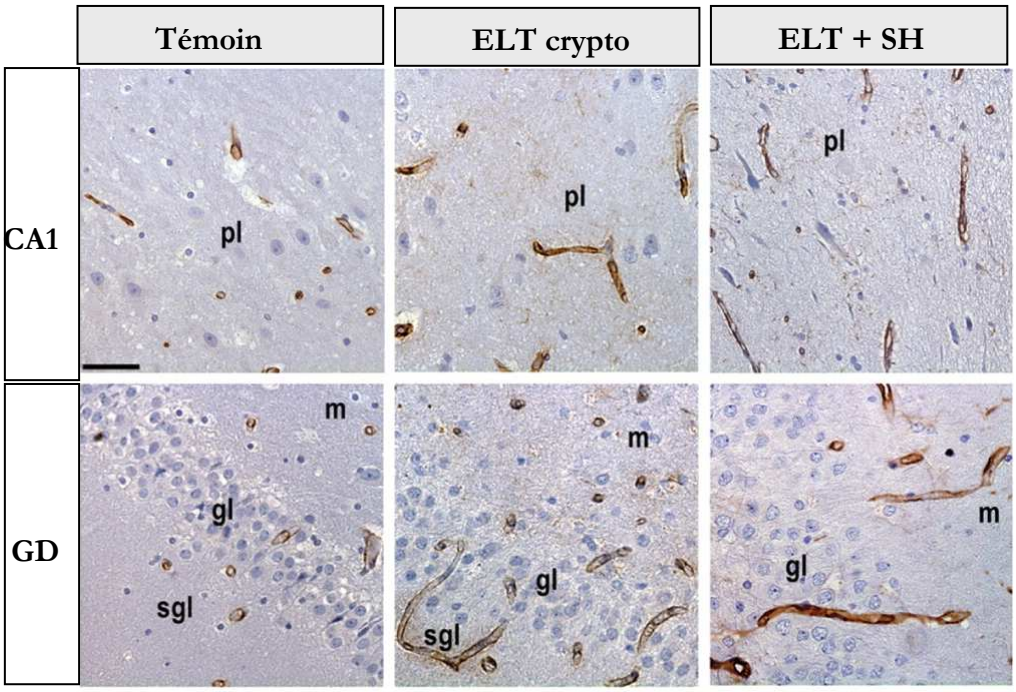


Figure 72 : Vascularisation chez un patient témoin et deux patients épileptiques
Aires CA1 et gyrus denté. ELT cryptogénique ELT avec sclérose hippocampique (SH).
Von Willebrand Factor, Hématoxyline. Barre d'échelle : 50µm. pl : couche pyramidale ; m : couche moléculaire ; gl couche granulaire, sgl : couche sous-granulaire ***Rigau, Morin et al 2007***

Nous avons alors retrouvé des changements vasculaires comparables dans l'épilepsie limbique du rat, qui se développe progressivement après un *status epilepticus* (SE) (modèle lithium-pilocarpine, *cf. chapitre I épilepsie*). Chez ces animaux, nous avons suivi l'évolution de la densité vasculaire depuis la phase aiguë (***SE***) jusqu'à la phase chronique. Nous avons constaté une néo-vascularisation dans l'hippocampe dès le début de la phase silencieuse, qui reste significativement augmentée à la phase chronique. Comme chez l'homme, les microvaisseaux du rat sont particulièrement concentrés dans les couches des corps cellulaires des neurones (Figure 73).

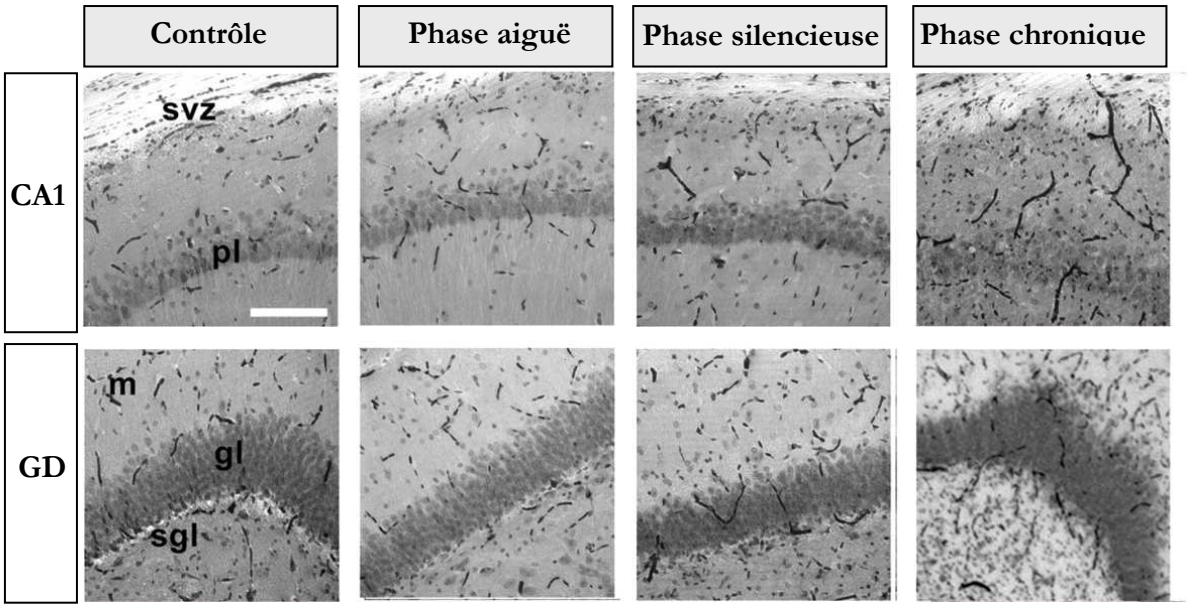


Figure 73 : Vascularisation des aires CA1 et du gyrus denté chez un animal contrôle et aux différentes phases de l'épileptogenèse.
Marquage des hématies par la di-aminobenzidine. Barre d'échelle : 100µm. pl : couche pyramidale ; m : couche moléculaire ; gl couche granulaire, sgl : couche sous-granulaire ; svz :zone sous ventriculaire
Rigau, Morin et al 2007

Un remodelage vasculaire est donc observé à la fois dans les foyers humains et animaux. Beaucoup de ces microvaisseaux dérivent des régions péri-ventriculaires mais de nombreux vaisseaux immatures irriguent toutes les zones du foyer.

Ces différents résultats sont en faveur d'une angiogenèse pathologique. Pour confirmer la présence de ce processus, nous avons recherché des facteurs angiogéniques dans les foyers épileptiques.

B. Présence de facteurs angiogéniques dans les ELTs

Le **VEGF**, est très faiblement exprimé par les neurones des patients témoins. Dans l'ELT, il est fortement surexprimé par les neurones et parfois par les astrocytes (Figure 74).

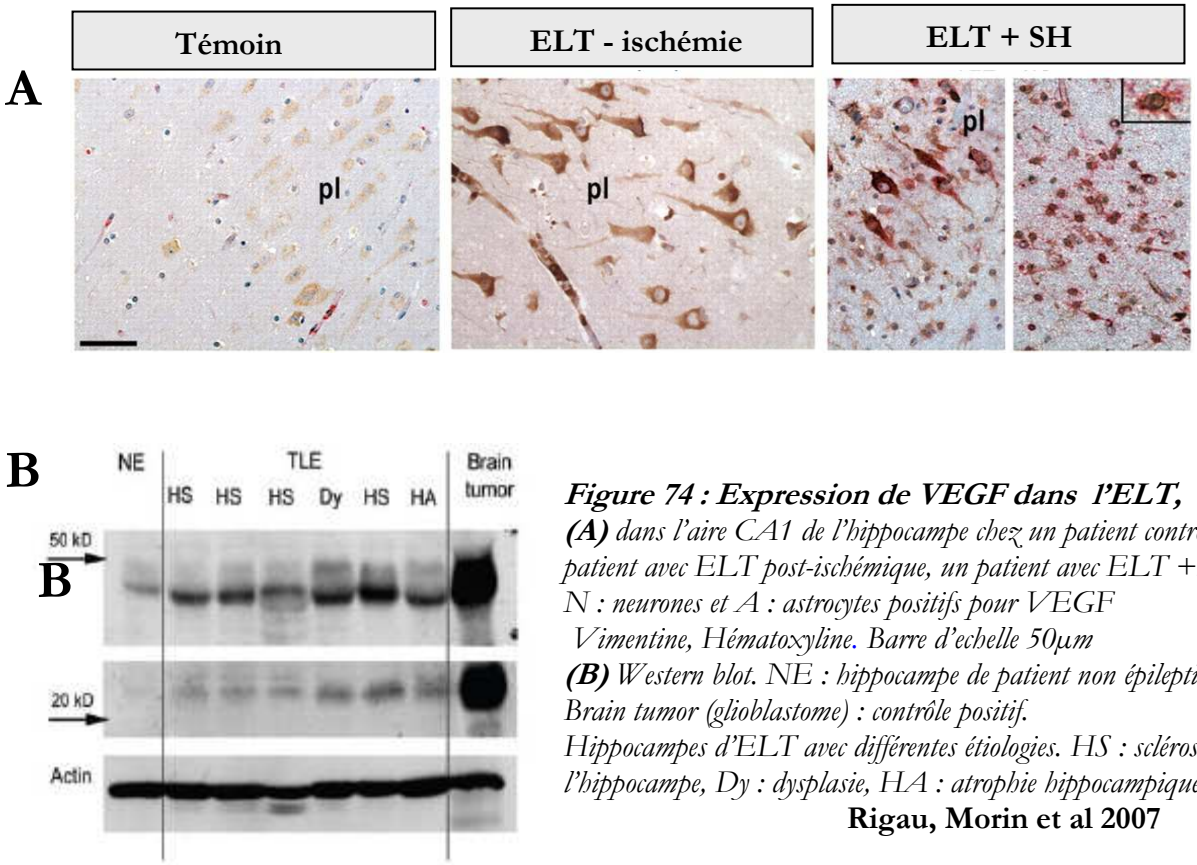


Figure 74 : Expression de VEGF dans l'ELT,
(A) *dans l'aire CA1 de l'hippocampe chez un patient contrôle, un patient avec ELT post-ischémique, un patient avec ELT +SH. N : neurones et A : astrocytes positifs pour VEGF Vimentine, Hématoxyline. Barre d'echelle 50µm*
(B) *Western blot. NE : hippocampe de patient non épileptique, Brain tumor (glioblastome) : contrôle positif. Hippocampes d'ELT avec différentes étiologies. HS : sclérose de l'hippocampe, Dy : dysplasie, HA : atrophie hippocampique.*
Rigau, Morin et al 2007

Dans le modèle animal, pendant le ***SE,*** on constate une expression très forte de VEGF par certains neurones, alors que d'autres semblent être déjà « vidés ». Le VEGF semble être stocké dans de grosses vésicules. Progressivement dans les phases silencieuse et chronique, les astrocytes prennent le relais, notamment dans l'aire CA1 où les neurones ont disparu (Figure 75).

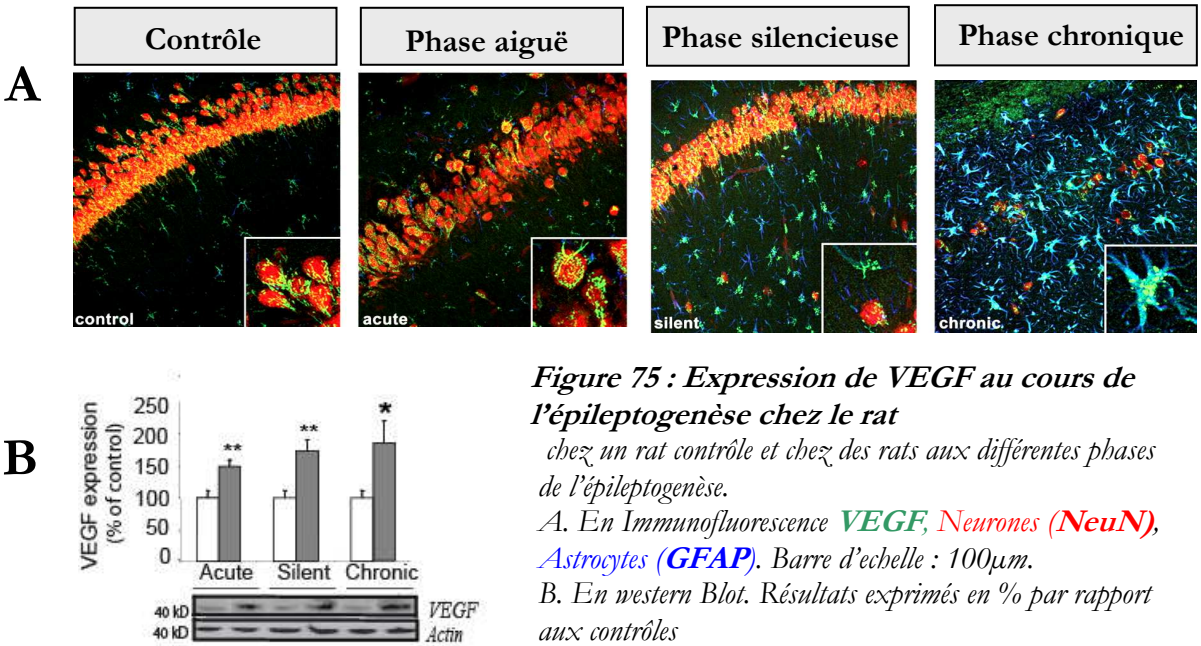


Figure 75 : Expression de VEGF au cours de l'épileptogenèse chez le rat
chez un rat contrôle et chez des rats aux différentes phases de l'épileptogenèse.
A. En Immunofluorescence ***VEGF****, Neurones (****NeuN****), Astrocytes (****GFAP****). Barre d'echelle : 100µm.*
B. En western Blot. Résultats exprimés en % par rapport aux contrôles
Rigau, Morin et al 2007

Le récepteur de VEGF (VEGFR-2) est présent dans toutes les régions de l'hippocampe chez les patients atteints d'ELT, plus particulièrement sur les microvaisseaux collatéraux, bourgeonnants et ramifiés.

Chez l'animal, contrôle, VEGFR-2 montre une expression basale dans les neurones. Très rapidement après le ***SE***, son expression est augmentée dans les neurones, mais surtout dans des cellules endothéliales situées sur les collatérales des microvaisseaux. Le récepteur reste surexprimé sur les neurones dans les phases chroniques et silencieuses (Figure 76).

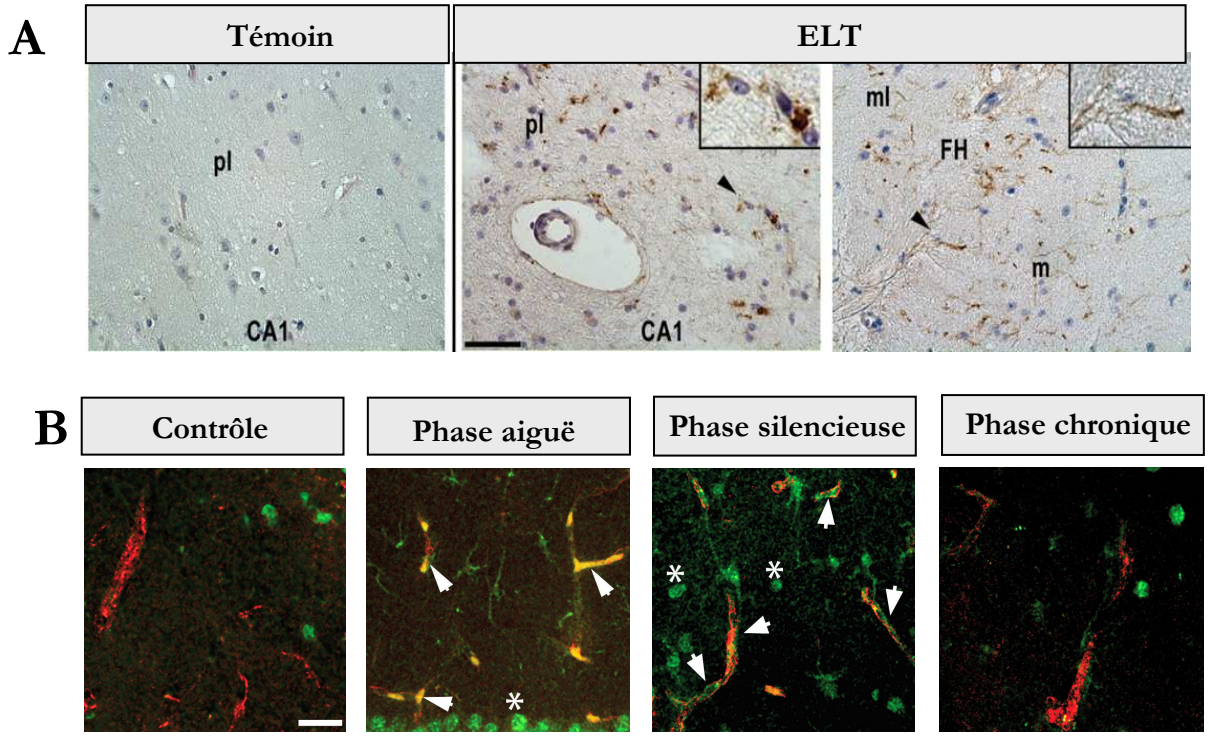


Figure 76 : Expression de VEGFR-2
(A)*. Dans l'aire CA1chez un patient contrôle et chez un patient avec ELT.*
Vimentine, Hématoxyline. Barre d'échelle 50µm. ***Rigau, Morin et al 2007***
(B)*. chez des rats contrôles et épileptiques (aux différentes phases de l'épileptogenèse).*
VEGFR-2*, Vaisseau (lectine* ***IB4****). Barre d'echelle : 25µm.* ***Morin et al soumis***

Nous avons ensuite recherché d'**autres facteurs angiogéniques** dans les foyers épileptiques, notamment le récepteur aux angiopoiétines, Tie2, crucial dans l'angiogenèse et dans la maturation de la BHE. Dans tous les hippocampes de patients atteints d'ELT, nous avons observé des cellules endothéliales plus ou moins matures, positives pour Tie2, particulièrement au niveau des parois vasculaires et des bourgeons capillaires.

Est-ce que le remodelage vasculaire affecte seulement l'hippocampe ou bien toutes les structures atteintes par la propagation des crises ?

Pour répondre à cette question, nous avons recherché la présence de facteurs angiogéniques dans le pôle temporal de patients atteints d'ELT. Les expressions de VEGF, VEGFR-2 et Tie2 estimées par western blot sont comparables à celles de l'hippocampe, indiquant une expression intense des facteurs angiogéniques dans toutes les régions du circuit épileptique, quelles soient lésées ou non (Figure 77).

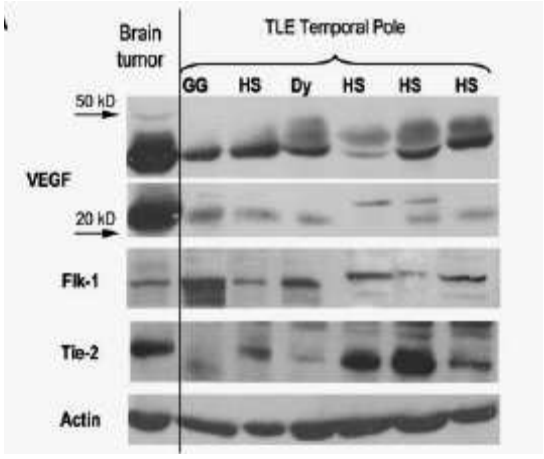


Figure 77 : Le VEGF, les récepteurs Flk-1 et Tie2 sont aussi fortement exprimés dans le pôle temporal, *structure non lésée mais atteinte par la propagation des crises, quelle que soit l'étiologie de l'épilepsie. Brain tumor (glioblastome) : contrôle positif. Etiologies des ELT : HS : sclérose de l'hippocampe, Dy : dysplasie, GG gangliogliome.*

Rigau, Morin et al 2007

Les facteurs et les récepteurs angiogéniques sont fortement exprimés pendant l'épileptogénèse et pendant la maladie chronique. Il y a apparemment un recouvrement des zones d'angiogenèse et des circuits de propagation des crises, et cela indépendamment des aspects étiologiques et lésionnels.

C. Rupture de la BHE dans les foyers épileptiques

Il semble qu'une crise épileptique suffise à surexprimer le VEGF dans les neurones et les astrocytes et que celui-ci soit rapidement sécrété, provoquant la rupture de la BHE. En effet, l'activation de VEGFR-2 par VEGF induit l'activation de kinases et phosphatases qui modifient les protéines des jonctions serrées induisant leur internalisation ou leur dégradation. De plus, le couple VEGF/VEGFR-2 active des métalloprotéases, notamment la MMP9 (*cf chapitre 2 Angiogenèse*). Nous avons étudié l'intégrité de la BHE par l'expression de la protéine cytoplasmique zonula occludens-1 (ZO-1) indispensable à la formation complète et fonctionnelle des TJs (*cf chapitre 3 BHE*).

C.1 Intégrité ou dégradation de la BHE

Sur le modèle animal, nous avons mis en évidence une perte significative de l'intégrité de la BHE dès le ***SE***, persistante en phase silencieuse et en phase chronique. Cette dégradation en phase chronique est semblable à celle que l'on observe dans les foyers humains (Figure 78).

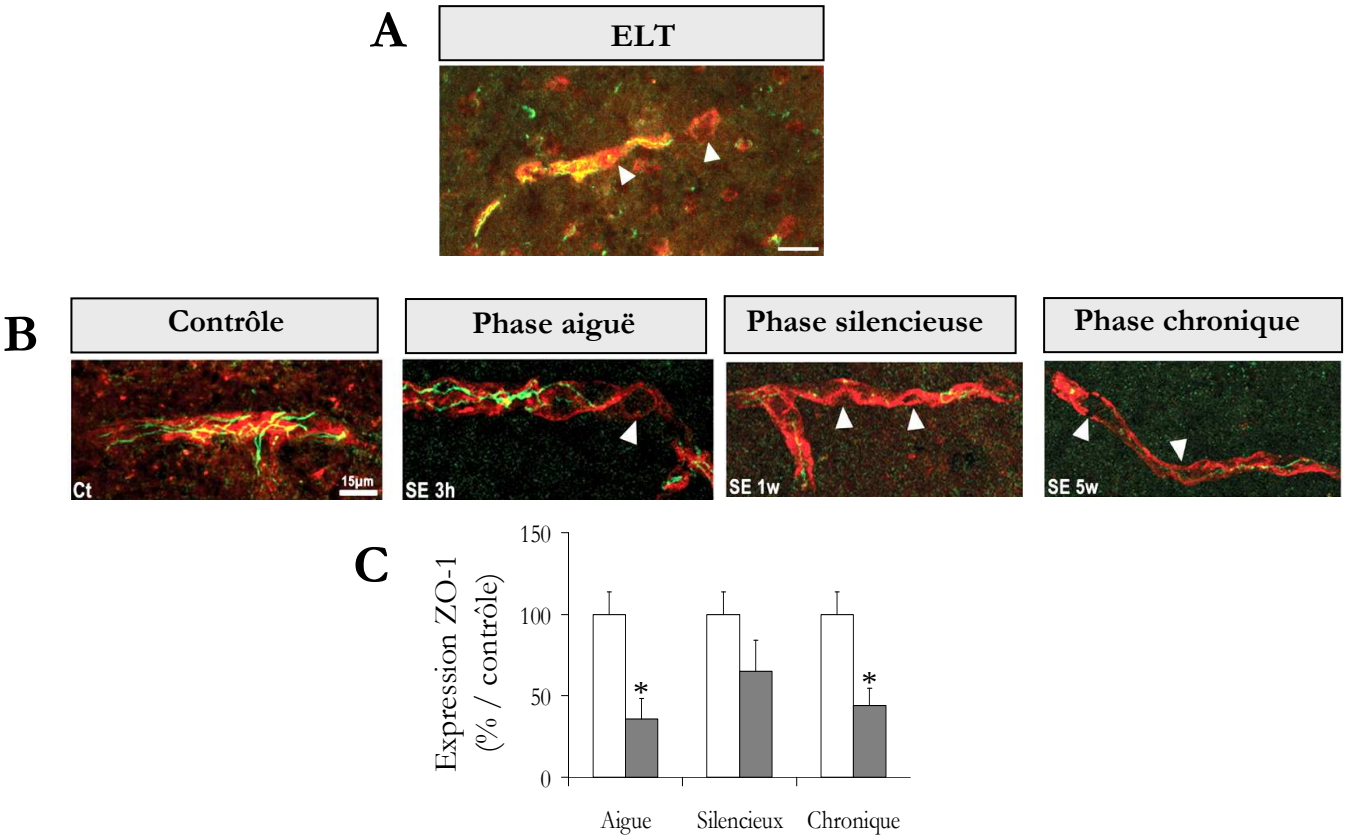


Figure 78 : intégrité de la BHE : expression de ZO-1
(A). *Chez un patient avec ELT.* ***ZO-1***, *Vaisseau (lectine* ***IB4****). Barre d'echelle 15µm.*
(B). *chez un animal contrôle et aux différentes phases de l'épileptogenèse.* ***ZO-1***, *Vaisseau (lectine* ***IB4****).*
Barre d'echelle : 15µm. ***Rigau,Morin et al 2007***
(C) *Expression de ZO-1, western blot chez un animal et aux différentes phases de l'épileptogenèse.*
Morin et al soumis

C.2 Perméabilité de la BHE

Nous avons évalué la perméabilité chez l'homme et l'animal par le marquage de protéines sériques qui diffusent dans le parenchyme, en l'occurrence les IgGs.

Nous avons observé des halos d'IgGs autour des microvaisseaux chez les patients épileptiques. Curieusement, on retrouve aussi des IgGs accumulées à l'intérieur de neurones à proximité des vaisseaux.

Dans le modèle animal, nous avons décelé des fuites immédiatement après le SE, et constaté l'accumulation d'IgGs dans les neurones, elle aussi très rapide et persistante.

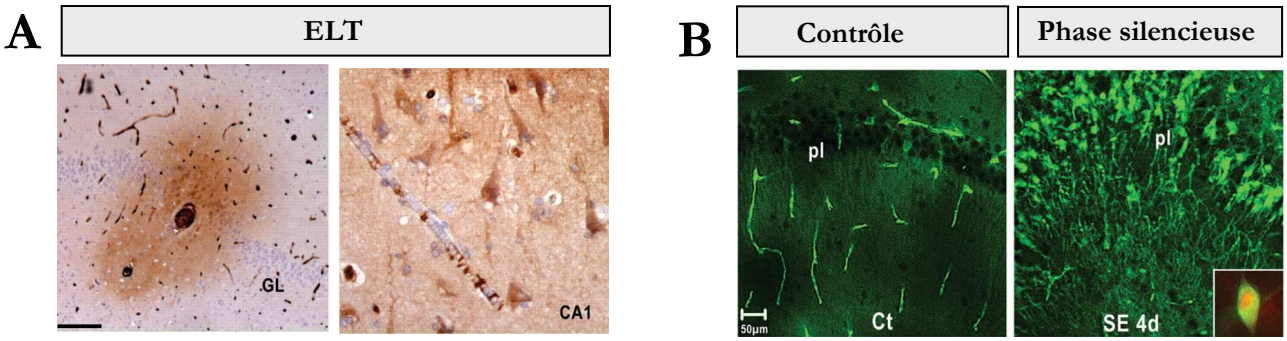


Figure 79 : Perméabilité de la BHE : Fuites d'IgGs sériques

(A)*. Hippocampe de patient avec ELT. Marquage des* ***IgGs*** *accumulées dans le parenchyme (gauche), et dans le cytoplasme des neurones (droite) Barre d'échelle 200µm.*

(B)*.Dans l'hippocampe d'un rat contrôle (gauche) et d'un rat épileptique en phase silencieuse (droite).* ***IgGs*** *dans les vaisseaux et les neurones de CA3. Barre d'échelle : 50µm.* ***Rigau, Morin et al 2007***

Ces premiers résultats montrent que :

Une véritable angiogenèse est déclenchée par les crises et persiste dans les foyers épileptiques ;

La néo-vascularisation des foyers est associée à une rupture de la BHE, responsable du passage de composants sanguins dans le parenchyme (cellules, protéines, ions…).

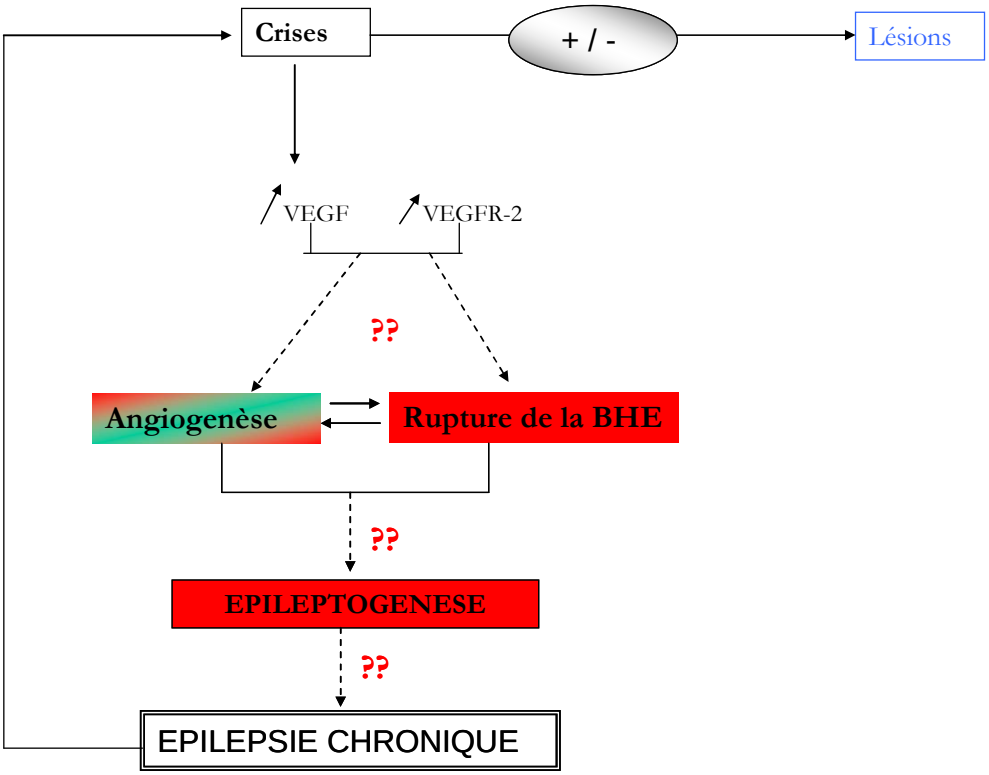


Figure 80 : Schéma du remodelage vasculaire induit par une crise (1)

Il est maintenant démontré que le couple VEGF/VEGFR-2 est impliqué dans l'angiogenèse observée dans plusieurs pathologies cérébrales comme les gliomes (Machein, M. R., *et al. - 2000*), ou l'ischémie (Croll, S. D., *et al. - 2001*, Zhang, Z., *et al. - 2002*). Outre son rôle dans la genèse de nouveaux vaisseaux, l'activation de VEGFR-2 par VEGF est connue pour participer à la perméabilité de la BHE, notamment dans les encéphalites (Argaw, A. T., *et al. - 2009*), la SLA (Ay, I., *et al. - 2008*) ou encore l'ischémie (Zhang, Z. G., *et al. - 2000*).

A ce jour, aucune étude ne prouve l'implication du VEGF dans l'angiogenèse et la rupture de la BHE des foyers épileptiques. Or, il est admis par la communauté épileptologue que la perméabilité de la BHE est une condition épileptogène.

L'objectif de la suite de nos travaux est donc de confirmer ou d'infirmer que le VEGF est responsable de la rupture de la BHE et, indirectement, de ses conséquences épileptogènes.

RESULTATS

CHAPITRE II

IMPLICATION DU VEGF DANS L'ANGIOGENSESE ET LA RUPTURE DE LA BHE SECONDAIRE AUX CRISES

Pour nos investigations sur le rôle du VEGF dans le remodelage vasculaire des foyers épileptiques, nous avons utilisé un modèle *in vitro* original : la **culture organotypique d'hippocampe (COH)**. Ce modèle présente les avantages de conserver tous les types cellulaires et leurs connexions ; de plus l'accès au milieu de culture permet une approche pharmacologique plus aisée que l'*in vivo*. Une étude récente sur des cultures organotypiques de cortex, montre que les vaisseaux sont intacts malgré l'absence de sang, et répondent à différents stimuli angiogéniques comme l'hyperthermie ou du VEGF appliqué dans le milieu de culture (Moser, K. V., *et al. - 2003*).

Pour différencier le rôle de la crise elle-même et celui des lésions secondaires aux crises dans l'induction du VEGF, nous avons développé deux modèles de crises épileptiques : un modèle lésionnel (« **kainate** ») et un modèle non lésionnel (« **bicuculline** »).

Le kainate est un agoniste d'un récepteur ionotrope du glutamate. Il provoque des crises suivies par une mort neuronale « excitotoxique » et une gliose, plus particulièrement dans l'aire CA3 où ce récepteur est particulièrement exprimé (Holopainen, I. E., *et al. - 2004*).

La bicuculline, antagoniste des récepteurs GABA-A induit seulement des crises, sans perte neuronale ni gliose (Figure 81).

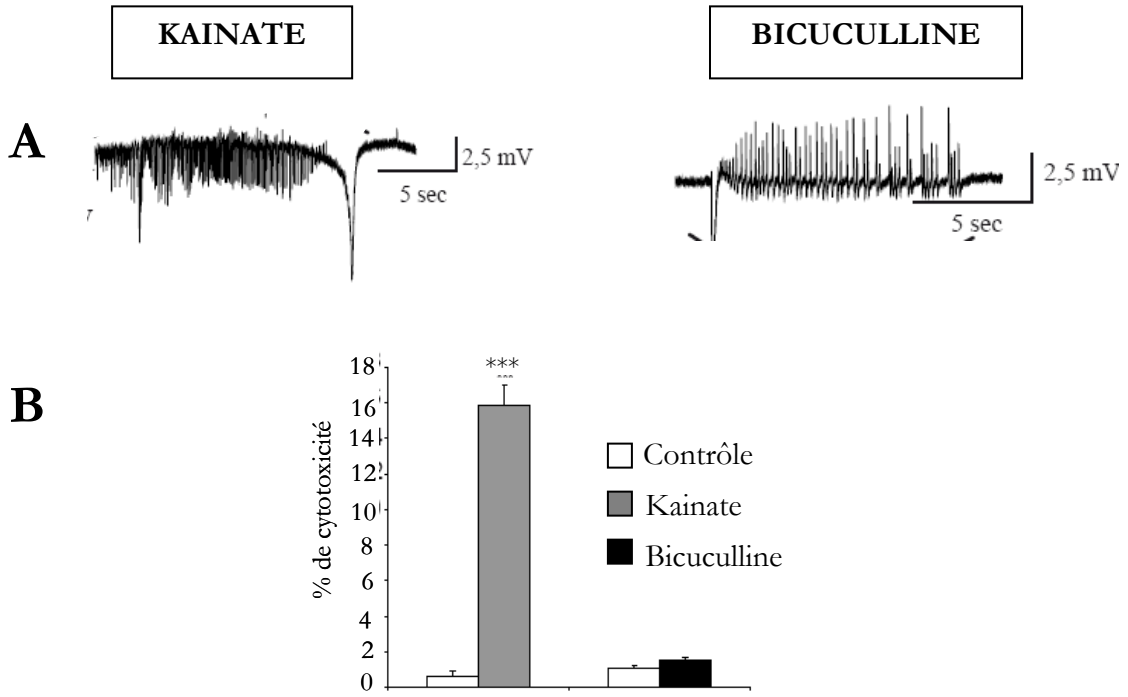


Figure 81 : Modèles in vitro de crises avec ou sans lésions secondaires
(A)*. des crises de l'aire CA1 (enregistrement extracellulaires,(potentiels de champs)*
(B). *Effet des crises induites par le kainate ou la bicuculline sur la cytotoxicité. (mesure de l'activité de la LDH 24 heures après les crises)*

Morin et al Soumis

A. Les crises sont suffisantes pour induire l'angiogenèse

Dans un premier temps, nous avons recherché une néo-vascularisation comparable à celle observée *in vivo* dans les deux modèles *in vitro*. Pour cela, les cultures ont été traitées avec du kainate ou de la bicuculline et la vascularisation a été observé à 4, 14 ou 24 heures après les crises (Figure 82).

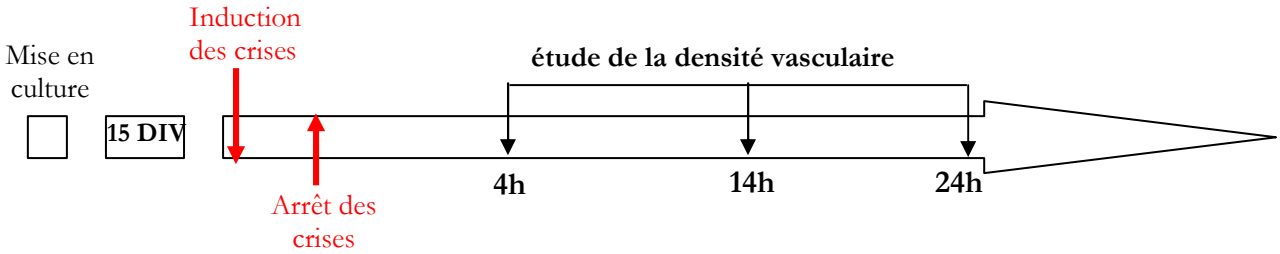


Figure 82 : protocole expérimental de l'étude de la densité vasculaire

Les COHs témoins présentent de larges microvaisseaux dérivant des zones péri-ventriculaires et de la fissure hippocampique. La quantification de la densité vasculaire n'a révélé aucune augmentation de la densité vasculaire 4 et 14 heures après les crises induites dans les deux modèles. Vingt-quatre heures après les crises, nous avons observé une augmentation significative de la densité vasculaire (≈ 25%), aussi bien dans le modèle kainate que le modèle bicuculline. Dans ces deux modèles le « branching » est intense et des capillaires tortueux sont visibles dans toutes les aires de l'hippocampe (CA1, CA3 et GD) (Figure 83).

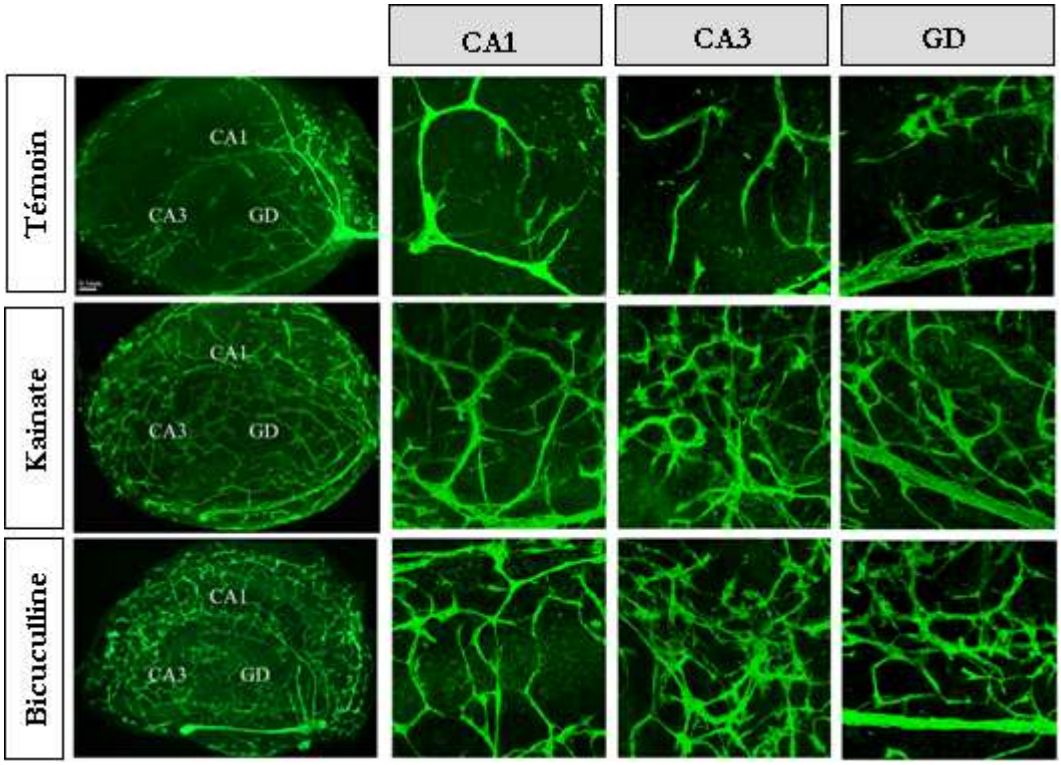


***Figure 83** : Vascularisation des COHs.*
Marquage des vaisseaux ***(laminine)*** *24 hs après les crises induites par les 2 modèles. Barre d'échelle : 400µm. Zoom dans 3 aires importantes de l'hippocampe CA1, CA3 et GD, barre d'echelle : 50µm* ***Morin et al Soumis***

Ces résultats indiquent qu'une crise épileptique est suffisante pour induire une neo-vascularisation dans les foyers épileptiques. Ils nous permettent de proposer les COHs comme un modèle, in vitro mais intégré, de neuro-angiogenèse, pouvant être appliqué à diverses pathologies cérébrales.

Pour valider ce modèle dans notre étude, il fallait qu'il reproduise la rupture de la BHE.

B. Les crises induisent une dégradation des jonctions serrées de la BHE

Nous avons évalué l'intégrité de la BHE par l'expression et/ou la localisation des protéines de jonctions serrées, plus précisément ZO-1, l'occludine et la claudine-5 selon le protocole suivant (Figure 84).

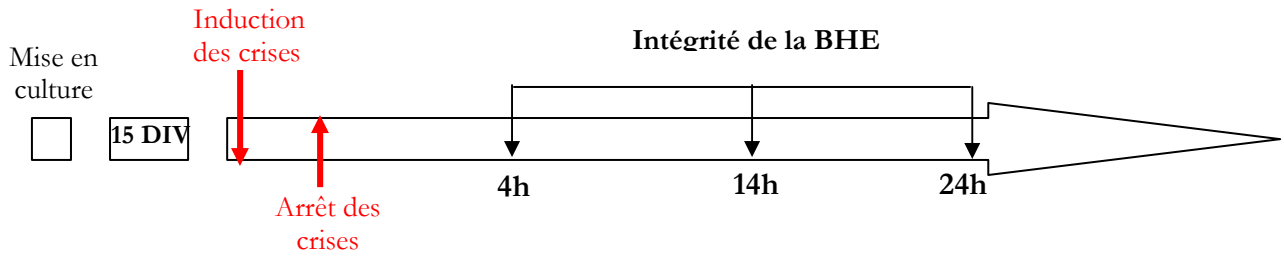


Figure 84 : Protocole expérimental pour l'étude de l'intégrité de la BHE

B.1 Expression et localisation de la protéine d'échafaudage « zonula occludens-1 »

Les vaisseaux des COHs témoins expriment la protéine ZO-1 le long des micro-vaisseaux, de la même façon qu'*in vivo* (Figure 85-A). Quatre heures après la crise, nous avons observé une disparition importante de la protéine (environ - 55%), dans les deux modèles. Mais cette perte est persistante seulement dans le modèle lésionnel et transitoire dans le cas de crises non lésionnelles. L'expression est toujours diminuée de 55% 24 heures après les crises induites par le kainate (Figure 85-B).

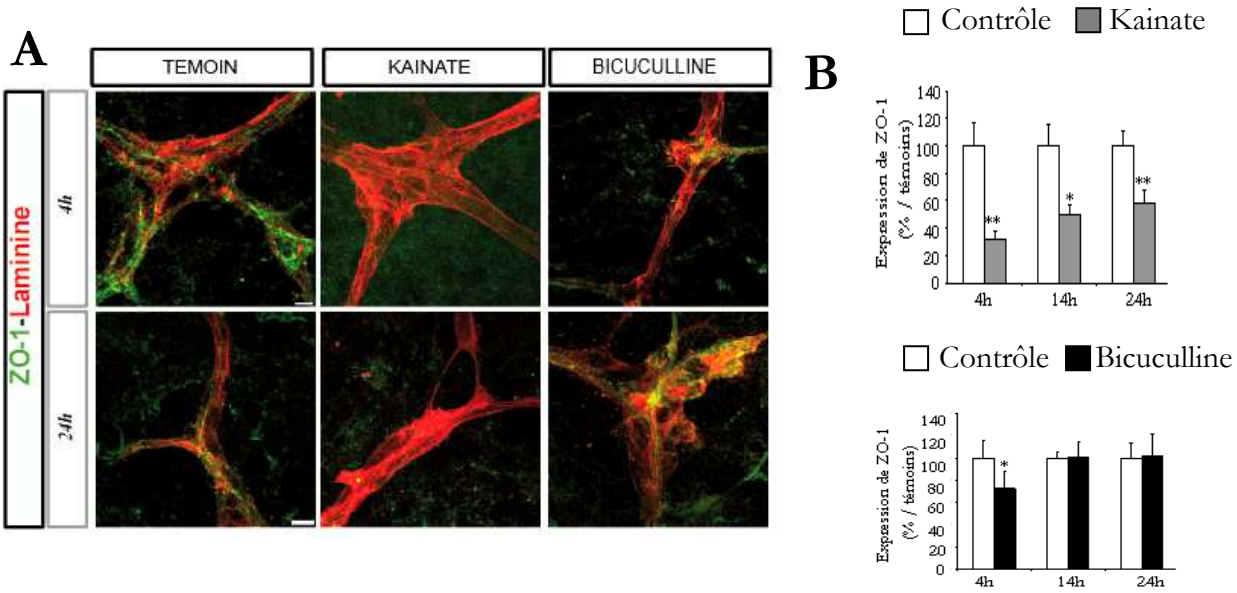


Figure 85 : Intégrité de la BHE après les crises
***(A)**. Localisation par immunofluorescence de **ZO-1** et des vaisseaux (**laminine**) 4 heures et 24 heures après les crises induites par le kainate ou la bicuculline Barre d'échelle : 10µm.*
***(B)**. Quantification de l'expression de ZO-1 (western blot)*
Morin et al Soumis

B.2 Evaluation de protéines transmembranaires des jonctions serrées

Au niveau de la BHE, deux protéines membranaires sont présentes : l'occludine et la claudine-5. Nous avons évalué, par western blot l'expression de ces protéines après les crises.

Nous avons pu observer que l'expression de la claudine-5 et de l'occludine est diminuée significativement 4h après les crises dans les deux modèles. Cependant, à 24 heures, pour les deux protéines l'expression est semblable, voire supérieure, à celle de la valeur contrôle dans le modèle bicuculline (Figure 86).

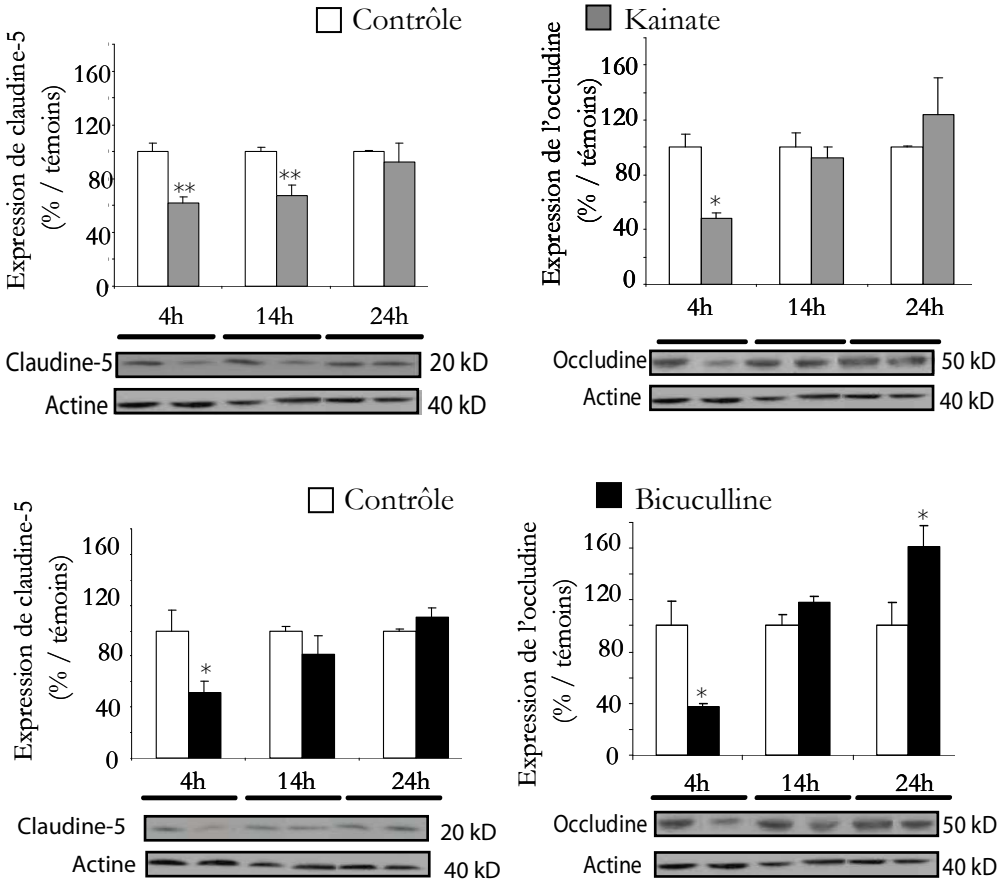


Figure 86 : Expression de l'occludine et de la claudine-5
Quantification du western blot, dans les 2 modèles de crises

Bien que la claudine-5 et l'occludine soient impliquées dans l'augmentation de la TEER et la formation des TJs, la perte de ZO-1 révèle que l'intégrité de la BHE n'est pas parfaitement retrouvée. En effet, ZO-1 est absolument nécessaire à la localisation de ces protéines à la membrane (Sandoval, K. E., *et al. - 2008*).

Ces résultats permettent de conclure qu'une crise est suffisante pour altérer l'intégrité de la BHE. Cependant, nous montrons ici que cette dégradation persiste dans le modèle lésionnel alors qu'elle est transitoire dans le modèle non lésionnel. Il est très probable que des pertes neuronales et la gliose entretiennent la dégradation ou inhibent des processus réparateurs.

C. Les crises induisent l'expression de VEGF et de VEGFR-2

Comme chez l'homme et l'animal épileptiques, nous avons observé dans les COHs une augmentation de l'expression de VEGF et de son récepteur VEGFR-2. Le protocole expérimental est identique à celui utilisé précédemment.

C.1 Expression, sécrétion et localisation cellulaire de VEGF

L'étude en qPCR prouve que la surexpression de VEGF observée dans les deux modèles, passe par un système transcription-traduction et non par la traduction d'un pool d'ARNm déjà présent dans les cellules. En effet, on observe un pic significatif d'ARNm 4 heures après les crises (Figure 87-A).

La quantification de l'expression de la protéine de VEGF dans le tissu montre une augmentation significative, 14 heures après les crises, puis une diminution à 24 heures. L'ELISA révèle, à ce temps, un pic significatif de VEGF sécrété dans le milieu de culture des deux modèles.

L'expression basale de VEGF dans les neurones et quelques astrocytes présents autour des vaisseaux est visible dans les cultures témoins. Quatorze heures après une crise, on observe une augmentation du marquage de VEGF, très ponctiforme, dans les neurones et les astrocytes : le VEGF semble stocké dans de larges vésicules, probablement extracellulaires comme elles ont été décrites récemment par l'équipe de Di Liegro G (Schiera, G., *et al. - 2007*). A fort grossissement, nous avons pu distinguer la diffusion de VEGF autour des vaisseaux (Figure 87-B).

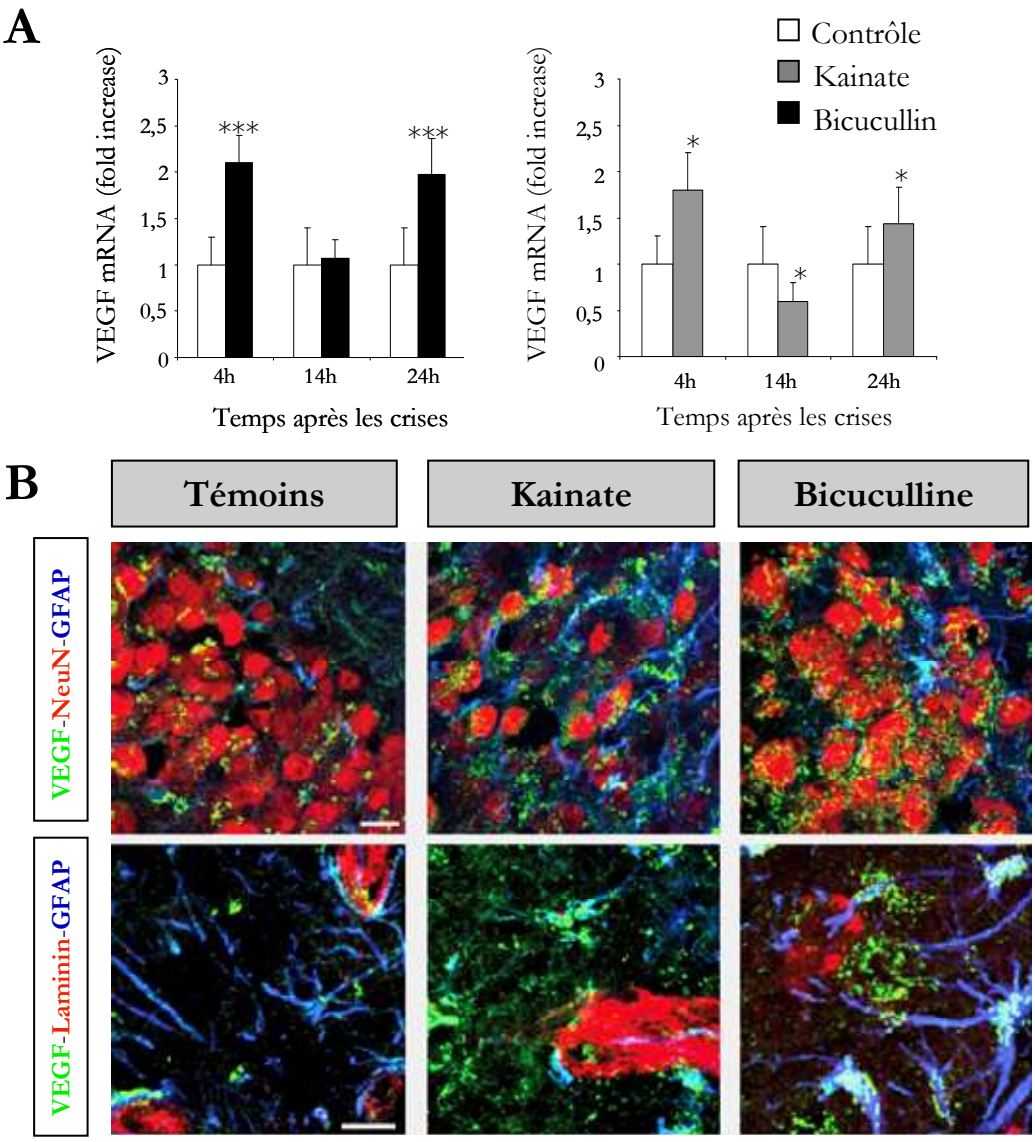


Figure 87 : Cinétique de l'expression de VEGF
(A). *Expression de l'ARNm de VEGF évalué par qRT-PCR*
(B). *Expression de* ***VEGF*** *par les neurones (**NeuN**) et autour des vaisseaux (**laminine**) et des astrocytes (**GFAP**) 14 heures après les crises Barre d'échelle : 10µm.*

Morin et al soumis

C.2 Expression et localisation cellulaire de VEGFR-2

Dans les COHs contrôles, nous avons remarqué l'absence de VEGFR-2, que se soit au niveau des neurones, astrocytes et micro-vaisseaux. Quatorze heures après les crises, VEGFR-2 est surexprimé dans le cytoplasme des neurones et des cellules endothéliales. Cependant, aucune expression du récepteur n'est retrouvée au niveau des astrocytes (Figure 88-A).

Le western blot a révélé une augmentation significative de l'expression de VEGFR-2 dans les deux modèles, 14 heures après les crises. Cependant, dans le modèle non lésionnel, cette

augmentation est transitoire, alors que dans le modèle kainate elle est toujours significative 24 heures après les crises. De la même façon que pour le VEGF, l'augmentation de VEGFR-2 passe par une synthèse d'ARNm avec un pic significatif dans les deux modèles 4 heures après les crises (Figure 88-B).

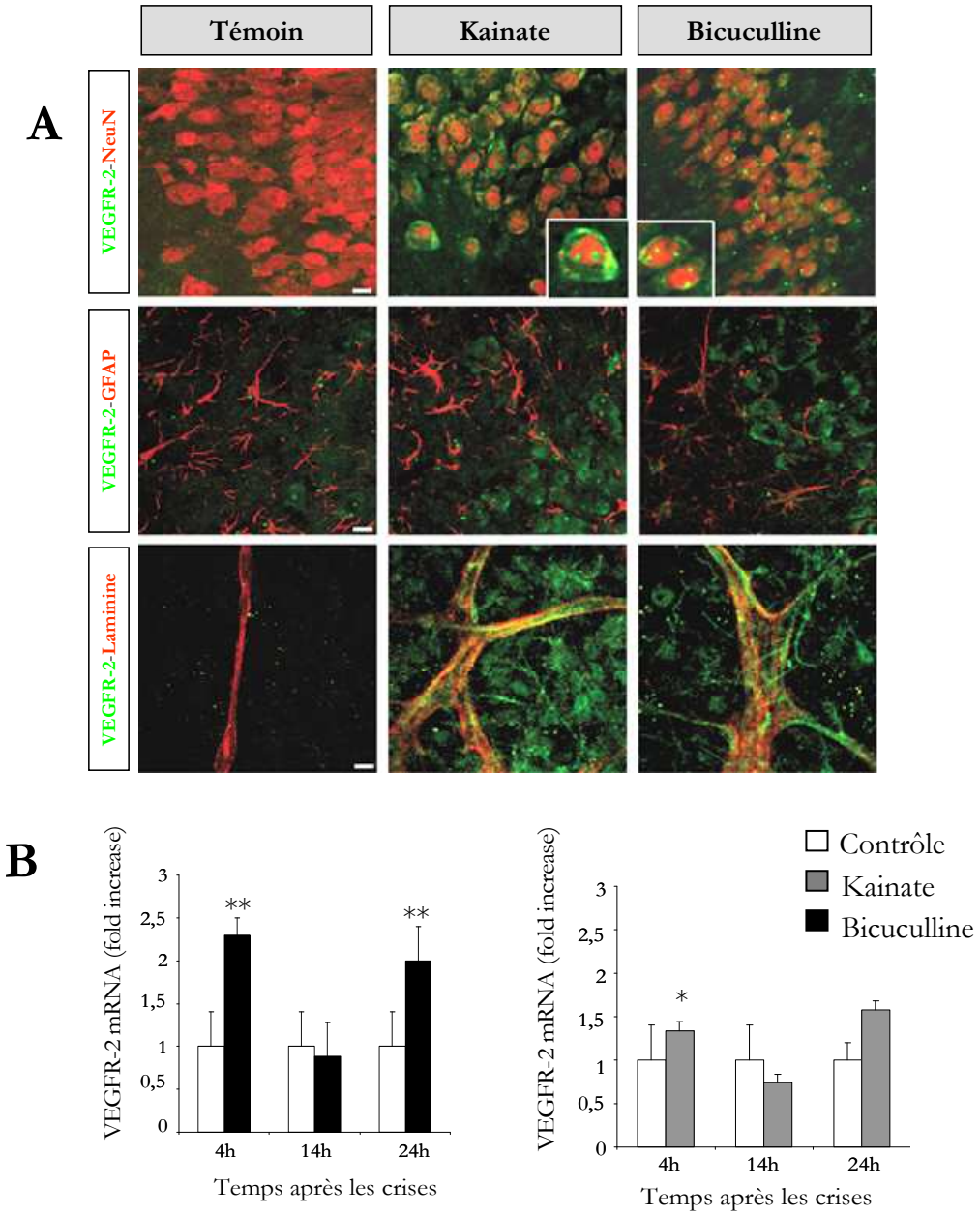


Figure 88 : Cinétique de l'expression de VEGFR-2
(A). *Expression de* ***VEGFR-2*** *au niveau des neurones (**NeuN**), des astrocytes (**GFAP**) ou des vaisseaux (l**aminine**)) 14 heures Barre d'échelle : 10µm.*
(B). *Expression de l'ARNm de VEGF évalué par qRT-PCR*

Morin et al, soumis

Ces résultats montrent que les crises elles-mêmes induisent la surexpression de VEGF et VEGFR-2 observée dans les foyers épileptiques.

Sachant que ce facteur est primordial dans l'angiogenèse en condition pathologique et notamment l'ischémie cérébrale, est-ce que le VEGF est le principal facteur angiogénique responsable de la rupture de la BHE et de l'angiogenèse des foyers épileptiques ?

D. VEGF est-il nécessaire et suffisant pour induire une angiogenèse et une rupture de la BHE après une crise épileptique ?

Pour répondre à cette question nous avons utilisé deux approches. La première est l'application de VEGF recombinant dans le milieu de culture à la même concentration que celle que nous avons dosé par ELISA après les crises (Figure 89-A). La seconde est l'utilisation d'un anticorps neutralisant l'activité du VEGF, équivalent chez le rat du *bevacizumab* prescrit dans le traitement des cancers (Figure 89-B).

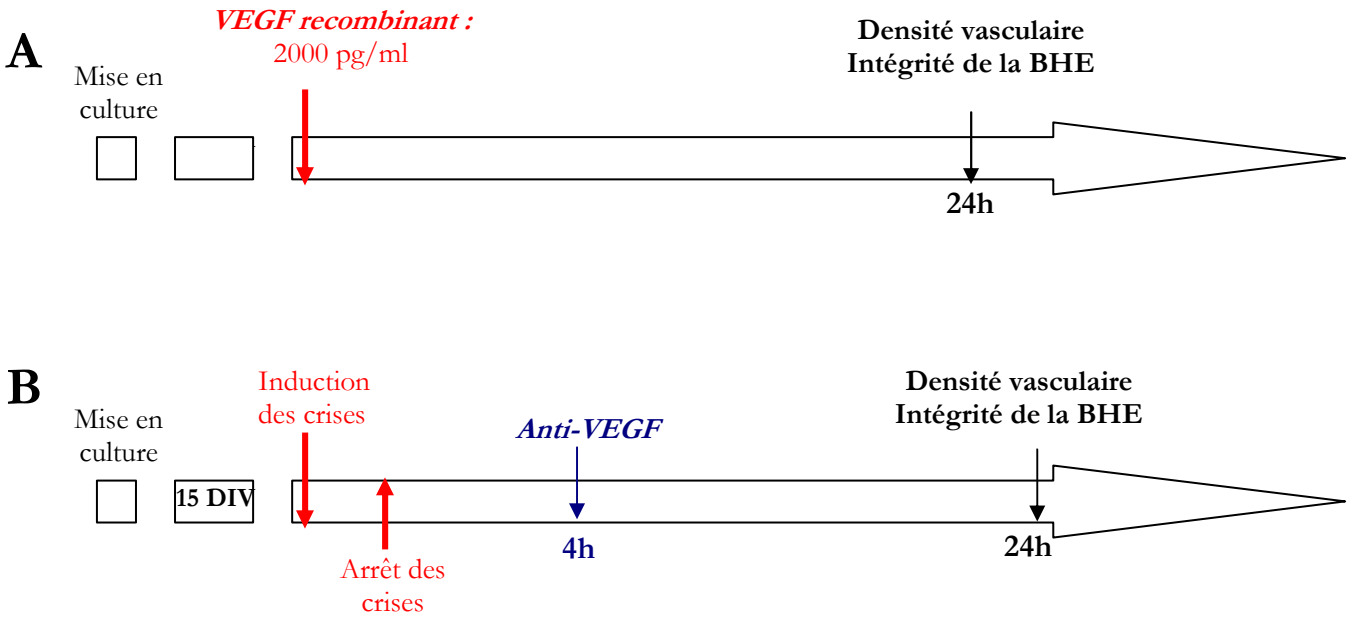


Figure 89 : Protocoles expérimentaux : applications de rVEGF ou de l'anticorps neutralisant le VEGF

D.1 Application de VEGF recombinant (rVEGF)

L'addition dans le milieu de culture, de 2000 pg/ml de rVEGF à la même concentration que celle du VEGF accumulé 24 heures après les crises provoque une augmentation de la densité vasculaire (≈ 20%) similaire à celle observée après les crises. Au niveau de la BHE, nous avons pu observer une diminution de 20% de l'expression de la protéine ZO-1, évaluée par western blot (Figure 90).

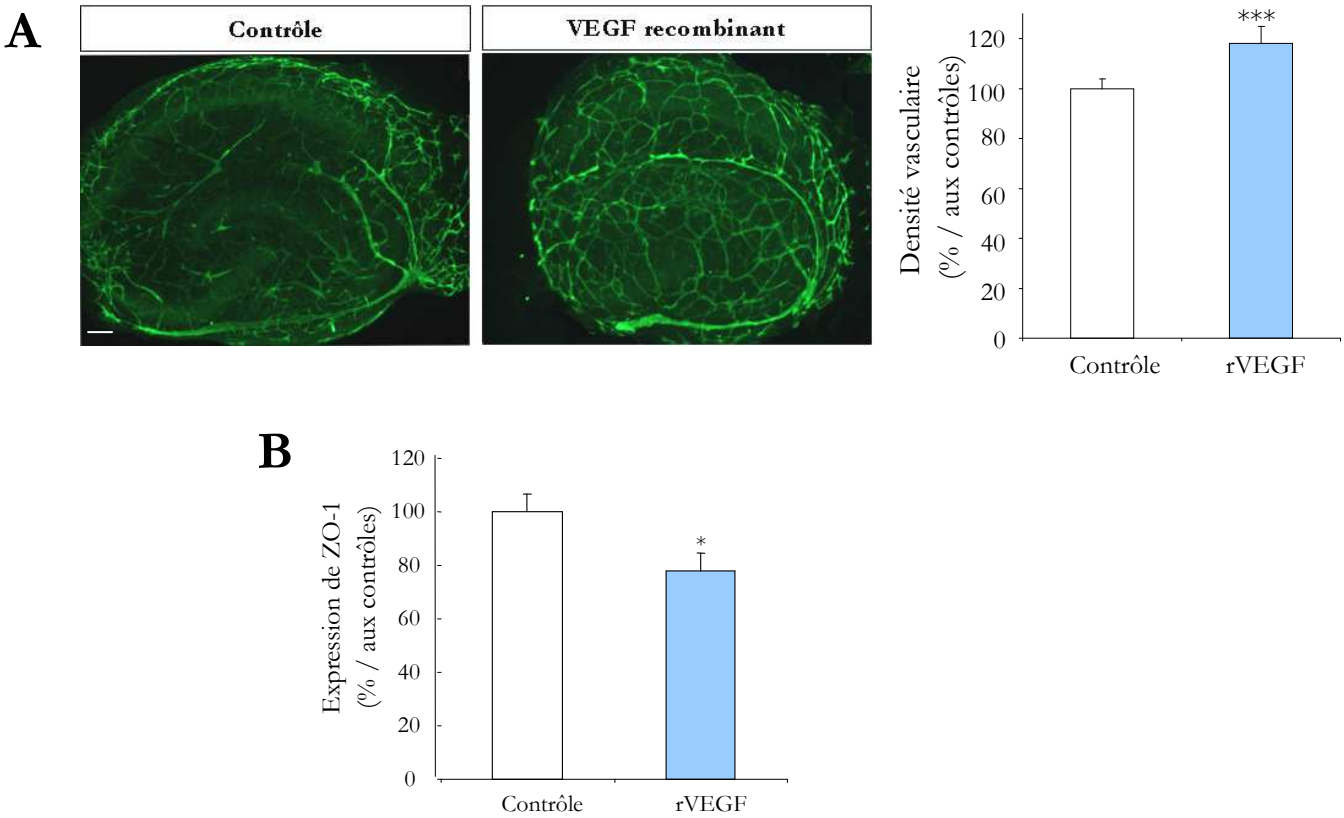


Figure 90 : Angiogenèse et intégrité de la BHE après application de rVEGF
(A)*. Marquage des micro-vaisseaux* ***(laminine)*** *24 heures après application de VEGF recombinant Barre d'échelle:400µm . Densité vasculaire représentée en pourcentage par rapport aux contrôles.*
(B). *Expression de ZO-1 évaluée par western blot et exprimé en pourcentage par rapport aux témoins*

D.2 Neutralisation de l'activité de VEGF

La neutralisation de l'activité de VEGF par un anticorps monoclonal provoque une inhibition quasi-totale de l'angiogenèse secondaire aux crises dans les deux modèles. La quantification de la

densité vasculaire révèle une vascularisation similaire pour les COHs contrôles et les COHs traitées par l'anticorps neutralisant après les crises (Figure 91).

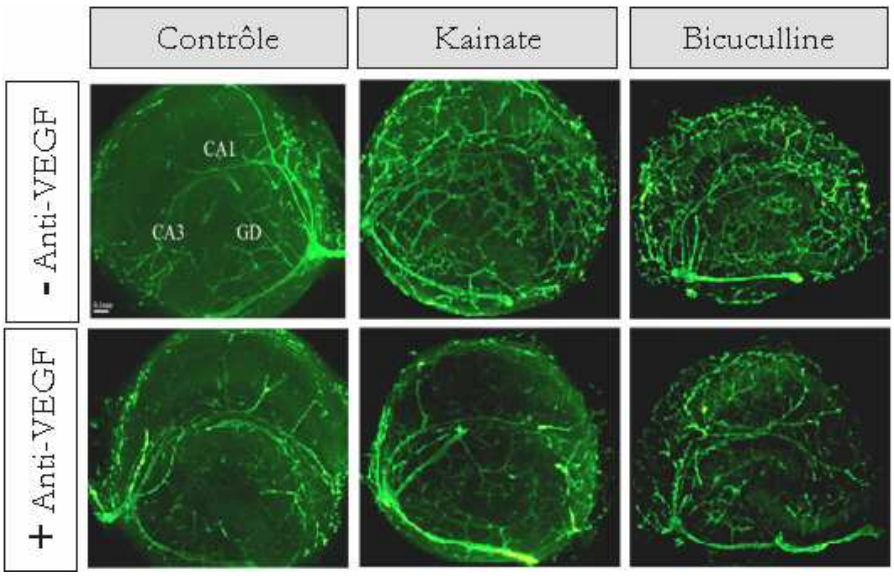


Figure 91 : Inhibition de la neo-vascularisation par la neutralisation du VEGF

Marquage des micro-vaisseaux ***(laminine)*** *24 heures après les crises induites par le kainate ou la bicuculline avec ou sans anticorps neutralisant l'activité de VEGF Barre d'échelle : 400µm.*

Morin et al, soumis

Au niveau de la BHE la neutralisation de VEGF restaure l'intégrité de la BHE dans le modèle kainate, 24 heures après les crises. En effet, nous avons pu observer la restauration de la protéine ZO-1 tout au long des vaisseaux dans les cultures traitées par avec l'anticorps neutralisant de VEGF. La quantification par western blot de la protéine des TJs montre une expression similaire à celle des COHs contrôles (Figure 92).

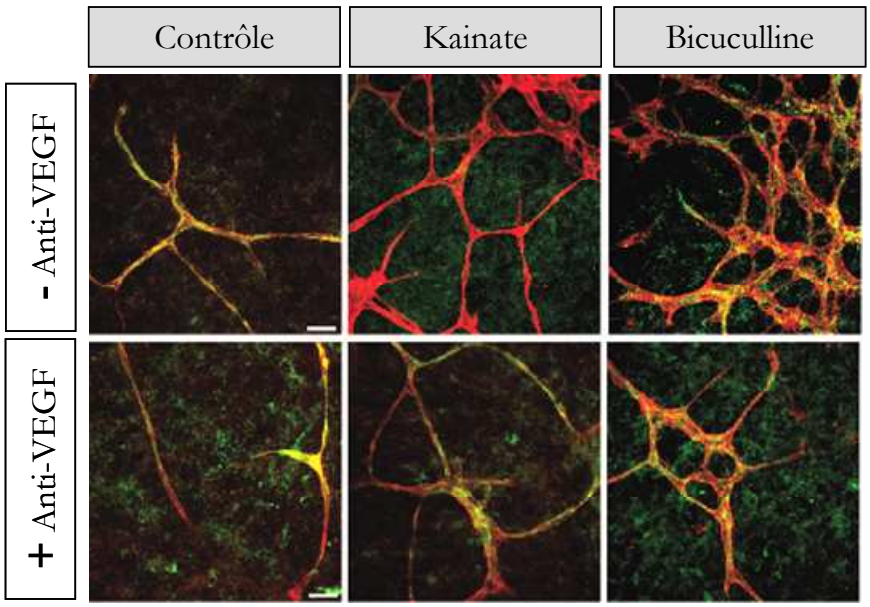


Figure 92 *: **Inhibition de la dégradation de la BHE par la neutralisation du VEGF***
*Expression de **ZO-1** au niveau des micro-vaisseaux **(laminine)** 24 heures après les crises induites par du kainate ou de la bicuculline, avec ou sans anticorps neutralisant l'activité de VEGF Barre d'échelle :10µm .* ***Morin et al, soumis***

Ces résultats montrent donc que le VEGF, surexprimé après les crises, est suffisant et nécessaire pour induire l'angiogenèse et la rupture de la BHE.

Comme nous l'avons déjà détaillé, l'activation de VEGFR-2 active de nombreuses voies de signalisation qui sont impliquées dans la prolifération des cellules endothéliales, la survie cellulaire mais aussi la perméabilité de la BHE.
Nous avons décrit précédemment que l'inhibition de la liaison de VEGF à VEGFR-2 empêche à la fois l'angiogenèse et la rupture de la BHE.

Nous nous sommes donc intéressés par la suite aux voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse et la dégradation de la BHE dans nos modèles.

E. Activation du couple VEGF/VEGFR-2 : implication des voies src, PI3K et PKC

D'après la littérature, 3 voies de signalisation activées par VEGFR-2, sont essentielles dans la survie cellulaire, l'angiogenèse et la perméabilité de la BHE : les voies src, PI3kinase et PKC, selon les conditions et les récepteurs activés. En effet, concernant la perméabilité de la BHE, on

rapporte un rôle important de src dans l'ischémie cérébrale (Takenaga, Y., *et al. - 2009*), de la PI3K quand elle est activée par Flt-1 (Vogel, C., *et al. - 2007*) et de la PKC en cas d'hypoxie (Fleegal, M. A., *et al. - 2005*). Au niveau de l'angiogenèse, un rôle de src et de PKC a été montré par plusieurs équipes (Lee, S. W., *et al. - 2003,* Spyridopoulos, I., *et al. - 2002*); de la même façon, ces 3 voies ont été décrites comme impliquées dans la neuroprotection (Bright, R., *et al. - 2005,* Hou, X. Y., *et al. - 2007,* Zhao, H., *et al. - 2006*). Cependant dans l'épilepsie, aucune de ces voies spécifiques n'a été évoquée comme intervenant dans la rupture de la BHE. Nous avons donc recherché une possible spécificité de voies activées par VEGFR-2 dans nos modèles selon le protocole suivant (Figure 93).

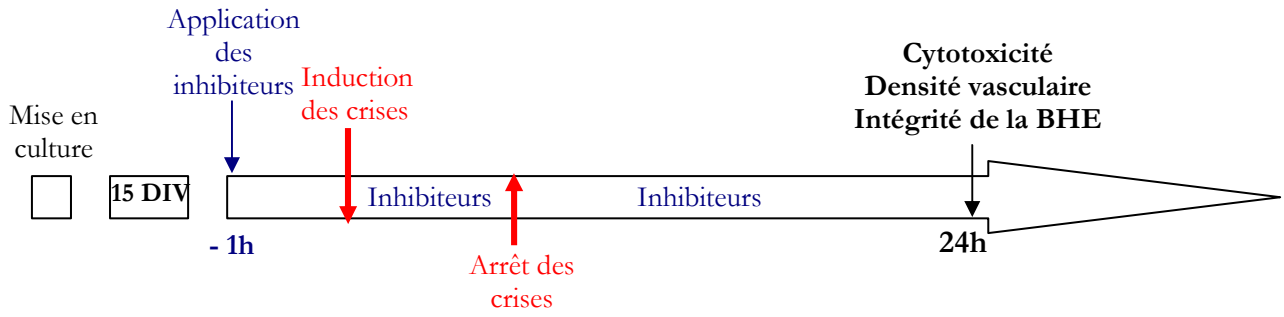


Figure 93 : Protocole expérimental de l'inhibition des voies de signalisation

E.1 Implication de la voie src (inhibition par PP2)

Au niveau de la toxicité, nous n'avons observé aucune cytotoxicité chez les témoins en présence d'inhibiteur. Dans les modèles kainate et bicuculline, la mort observée après les crises est identique, qu'il y ait ou non l'inhibiteur de src, suggérant que src n'est pas impliqué dans la survie cellulaire (Figure 94-A).

Nous avons étudié son effet sur la densité vasculaire secondaire après les crises, avec ou sans l'inhibiteur PP2. Les cultures contrôles ou traitées par le kainate ou la bicuculline ne montrent aucune modification significative de la densité vasculaire, comparées aux cultures n'ayant pas reçu d'inhibiteurs (Figure 94-B).

De la même façon, nous avons évalué l'expression de la protéine ZO-1 par western blot. La stimulation par le kainate induit une diminution de 50% de la protéine ZO-1 24 heures après les crises, comme nous l'avons vu précédemment. Cependant, en inhibant la voie src, nous avons observé que l'expression de ZO-1 était similaire à celle des témoins, voire même plus élevée.

Cette augmentation est significative par rapport aux cultures traitées au kainate. Quant au modèle bicuculline, l'inhibition de la voie src n'apporte aucune modification de l'expression de ZO-1 car dans ce modèle la BHE est spontanément reconstruite après les crises (Figure 94-C).

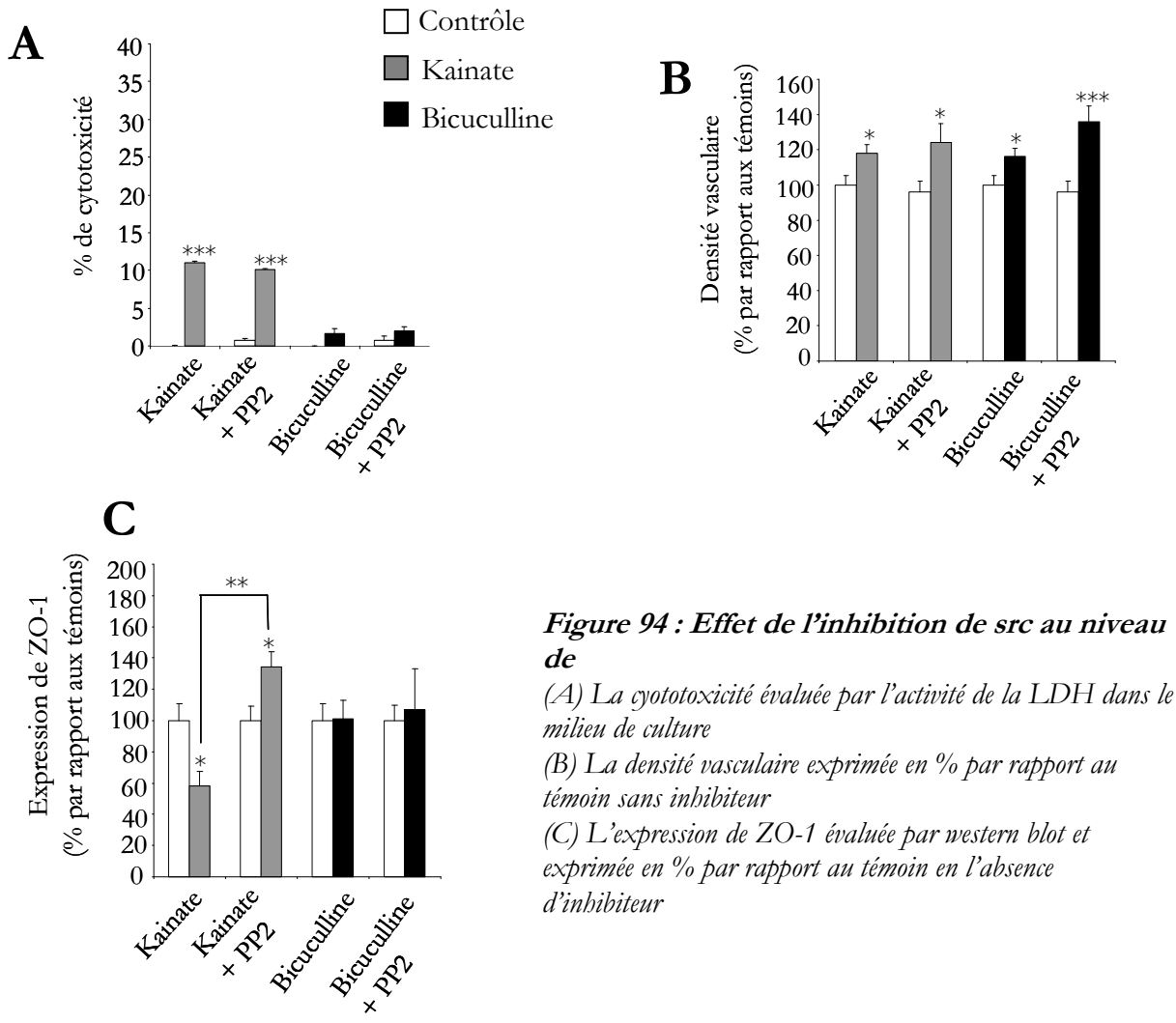


Figure 94 : Effet de l'inhibition de src au niveau de

(A) La cyototoxicité évaluée par l'activité de la LDH dans le milieu de culture

(B) La densité vasculaire exprimée en % par rapport au témoin sans inhibiteur

(C) L'expression de ZO-1 évaluée par western blot et exprimée en % par rapport au témoin en l'absence d'inhibiteur

La voie src, ne possédant aucun effet significatif sur la densité vasculaire ou la toxicité, est spécifiquement impliquée dans la perte d'expression de ZO-1, donc dans la dégradation de la BHE dans le modèle lésionnel.

E.2 Implication de la voie PI3K (inhibition avec LY294202)

A l'inverse de la voie src, l'inhibition de la voie PI3K induit une toxicité élevée. Nous avons observé dans les cultures contrôles, 24 heures après administration de l'inhibiteur, une toxicité de 10%, de 35% dans les cultures traitées au kainate et 12% dans les cultures traitées à la bicuculline

(Figure 95-A). Cette augmentation importante de cytotoxicité avec l'inhibiteur confirme le rôle neuro-protecteur de PI3kinase. En effet, PI3K active les voies de survie par l'activation de protéines anti-apoptotiques (Krasilnikov, M. A. - *2000*).

Au niveau de la densité vasculaire, nous avons pu observer une augmentation « anarchique » du nombre des vaisseaux dans les cultures témoins et dans les cultures traitées par kainate ou bicuculline. Nous pensons que la mort cellulaire évoquée ci-dessous active le système VEGF/VEGFR-2 par des facteurs inflammatoires (Figure 95-B).

L'expression de ZO-1 dans les cultures traitées avec cet inhibiteur montre une augmentation variable, mais non significativement, différente des conditions sans inhibiteurs (Figure 95-C).

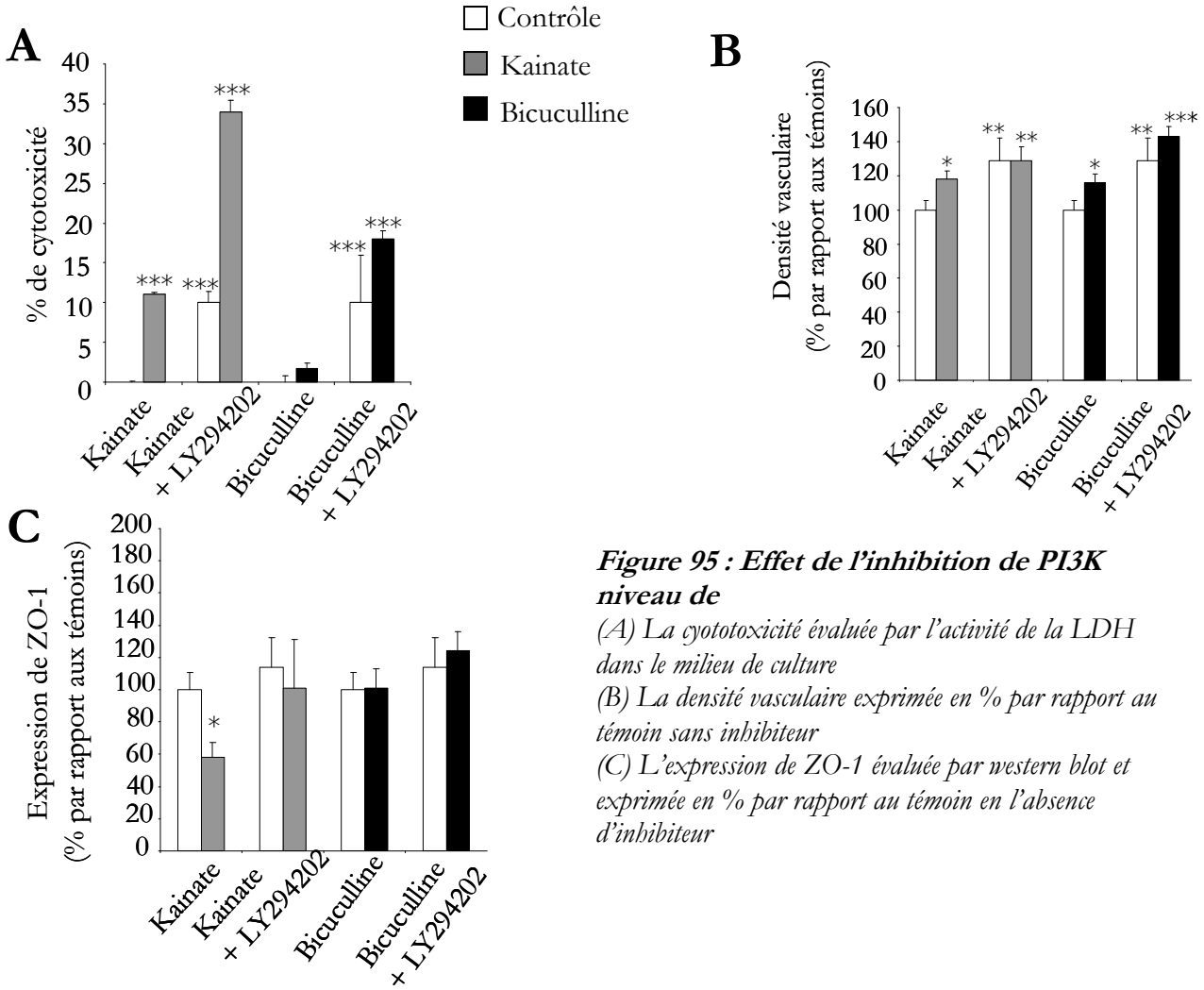


Figure 95 : Effet de l'inhibition de PI3K niveau de

(A) La cyototoxicité évaluée par l'activité de la LDH dans le milieu de culture

(B) La densité vasculaire exprimée en % par rapport au témoin sans inhibiteur

(C) L'expression de ZO-1 évaluée par western blot et exprimée en % par rapport au témoin en l'absence d'inhibiteur

Ces résultats indiquent que la voie PI3K est majoritairement impliquée dans la survie cellulaire après les crises. L'inhibition de cette voie provoque de la toxicité, même dans les cultures contrôles, conduisant à des effets importants sur la vascularisation rendant les interprétations impossibles.

E.3 Implication de la voie PKC

Comme la voie src, l'inhibition des PKC n'induit aucune cytotoxicité supplémentaire que celle induite par les crises.

En revanche, nous avons observé une réduction importante de l'angiogenèse secondaire aux crises. En effet, l'inhibition de la voie PKC n'a aucun effet sur les cultures contrôles mais elle ramène la densité vasculaire au niveau basal dans les 2 modèles de crises.

Quant à l'expression de ZO-1, nous n'avons observé aucune modification dans les cultures contrôles, alors qu'elle est augmentée dans les cultures traitées par le kainate et bicuculline. Cette protection de ZO-1 peut s'expliquer par l'inhibition des processus angiogéniques après les crises.

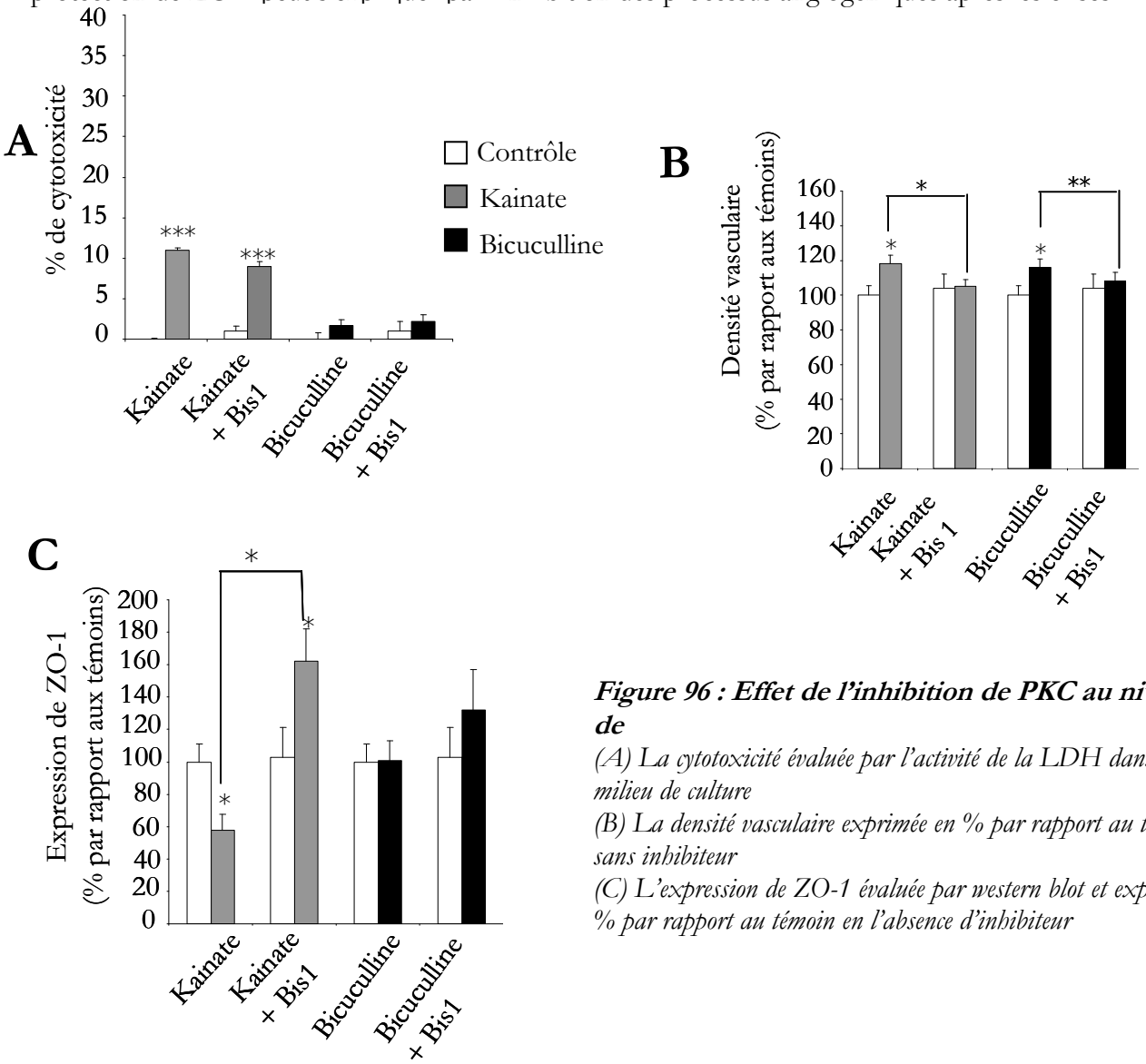


Figure 96 : Effet de l'inhibition de PKC au niveau de

(A) La cytotoxicité évaluée par l'activité de la LDH dans le milieu de culture

(B) La densité vasculaire exprimée en % par rapport au témoin sans inhibiteur

(C) L'expression de ZO-1 évaluée par western blot et exprimée en % par rapport au témoin en l'absence d'inhibiteur

Ces résultats semblent indiquer un rôle crucial de l'activation de la voie PKC dans l'angiogenèse secondaire aux crises.
La voie src ayant un effet très sélectif sur la restauration de la BHE, elle nous semble être intéressante à étudier pour comprendre les aspects transitoires ou durables de la dégradation de la BHE, qui différencient les modèles non lésionnels et lésionnels. Les mécanismes impliqués pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les modèles lésionnels et non lésionnels de crises *in vitro* comportent des ressemblances et des différences récapitulées dans le tableau suivant, qui nous permettant d'isoler des mécanismes délétères ou réparateurs dans l'épilepsie.

	KAINATE	**BICUCULLINE**
Crises	OUI	OUI
Lésions	OUI	NON
Angiogenèse	OUI via PKC	OUI via PKC
Rupture de la BHE	OUI et permanente Via Src	OUI et transitoire

Cette deuxième partie d'expériences complète notre schéma sur les conséquences vasculaires des crises, en prouvant que le **VEGF, surexprimé par les neurones et les astrocytes dans les foyers humains et animaux, était nécessaire et suffisant pour induire l'angiogenèse et la rupture de la BHE passant par la voie PKC et SRC respectivement** (Figure 97).
Nous avons observé que la rupture de la BHE pouvait être transitoire lors de crises non lésionnelles, suggérant que des processus de réparation ont lieu, qu'il serait intéressant d'étudier par la suite.

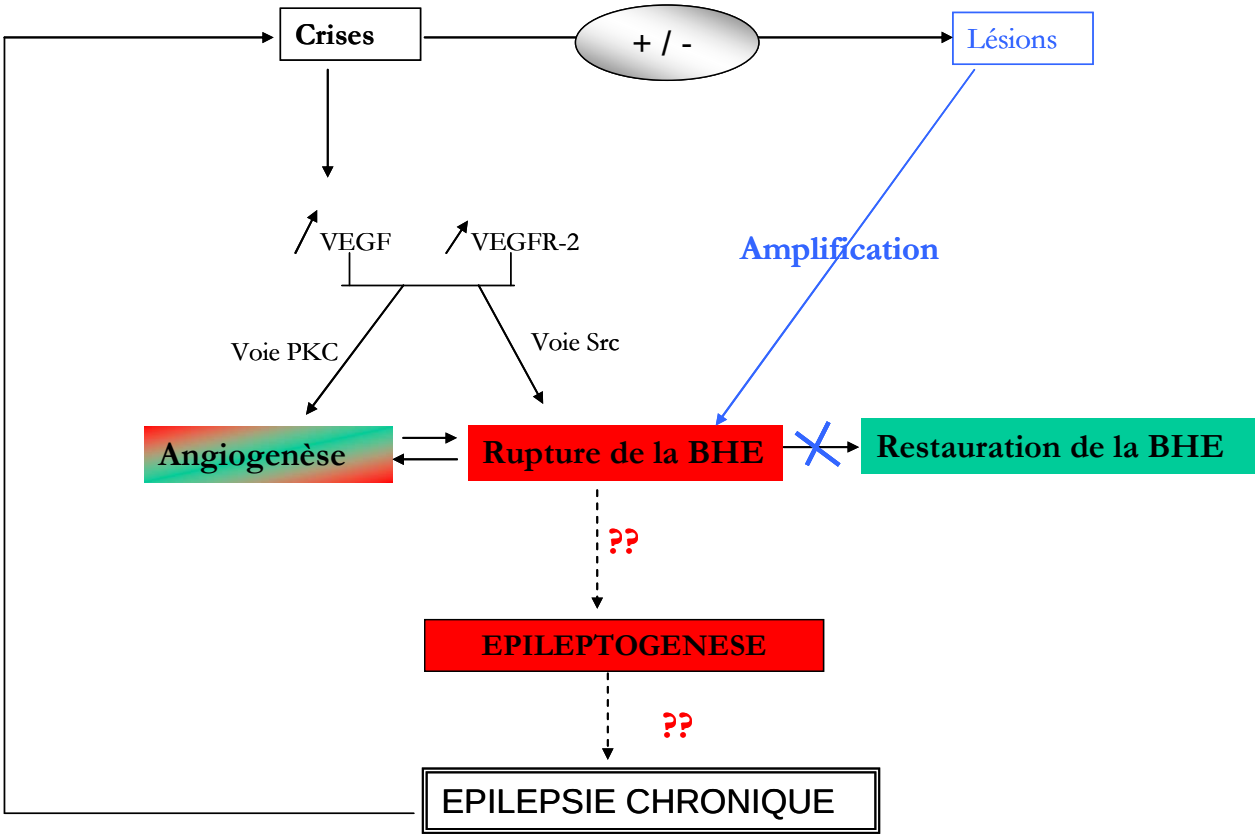


Figure 97 : Schéma du remodelage vasculaire après une crise (2)

Par la suite, cette thèse se focalisera sur les effets de l'angiogenèse et de la rupture de la BHE et recherchera une relation fonctionnelle entre ces remaniements et la chronicité de l'épilepsie.

RESULTATS

CHAPITRE III

EPILEPSIE CHRONIQUE ET RUPTURE DE LA BHE : DE NOUVELLES CIBLES THERAPUETIQUES ?

A. L'épilepsie chronique et les changements vasculaires sont dépendants de l'âge : processus de protection ?

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreux changements sont observés pendant l'épileptogenèse, dont trois processus importants : l'inflammation, l'angiogenèse et la rupture de la BHE (Ravizza, T., *et al. - 2008,* Rigau, V., *et al. - 2007,* Van Vliet, E. A., *et al. - 2007*). De plus, il a été montré qu'un *status epilepticus* (*SE*) chez un rat immature (PN9-PN15) n'induit pas une épilepsie chronique ultérieure, alors qu'à PN21, âge ou le réseau vasculaire est mature, un pourcentage significatif de rats développe des crises spontanées (Kubova, H., *et al. - 2004,* Roch, C., *et al. - 2002*).

En collaboration avec l'équipe d'Annamaria Vezzani (Mario Negri Institute, Milan), nous avons entrepris d'étudier les remodelages vasculaires et l'inflammation à court et long terme, chez des animaux à PN9 et PN21.

A.1 Après *status epilepticus* chez les rats PN9

A.1.1 Inflammation

L'inflammation a été étudiée par immunomarquage de l'IL-1β. Nous avons observé une expression similaire de cette cytokine dans l'hippocampe, le cortex et l'amygdale chez les rats contrôles et 1 semaine ou 4 mois post-SE (Figure 98).

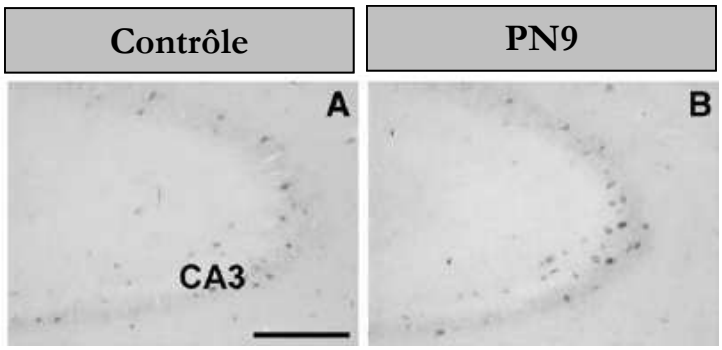


Figure 98 : Expression de l'IL-1β dans l'aire CA3 de l'hippocampe
chez un rat contrôle (A) et 1 semaine après un SE (B).
Révélation par peroxydase Barre d'échelle 100µm

(Marcon, J., et al. - 2009)

A.1.2 Perméabilité de la BHE

La perméabilité de la BHE a été évaluée de deux façons différentes : marquage de l'albumine et des IgGs. Ces protéines sériques sont absentes du parenchyme chez des animaux contrôles mais retrouvées accumulées dans le parenchyme cérébral et aussi dans des astrocytes et des neurones après des crises (Rigau, V., *et al. - 2007,* Van Vliet, E. A., *et al. - 2007*).

L'albumine-FITC injectée chez des rats contrôles et des rats 1 semaine post-SE est retrouvée dans les vaisseaux sans différence entre les rats. Aucune fuite n'était visible. Au niveau des IgGs aucun marquage n'est présent dans les cellules, que les animaux soient contrôles, ou à 1 semaine ou 4 mois post-SE (Figure 99).

Il faut cependant noter que chez les contrôles comme chez les rats traités à la pilocarpine, on retrouve des marquages d'albumine et d'IgGs dans le parenchyme, traduisant l'absence de barrière ou une barrière immature et perméable. L'absence d'albumine ou d'IgGs accumulées dans les neurones ou astrocytes suggère un possible phénomène de protection chez les jeunes rats, pendant le développement de la BHE.

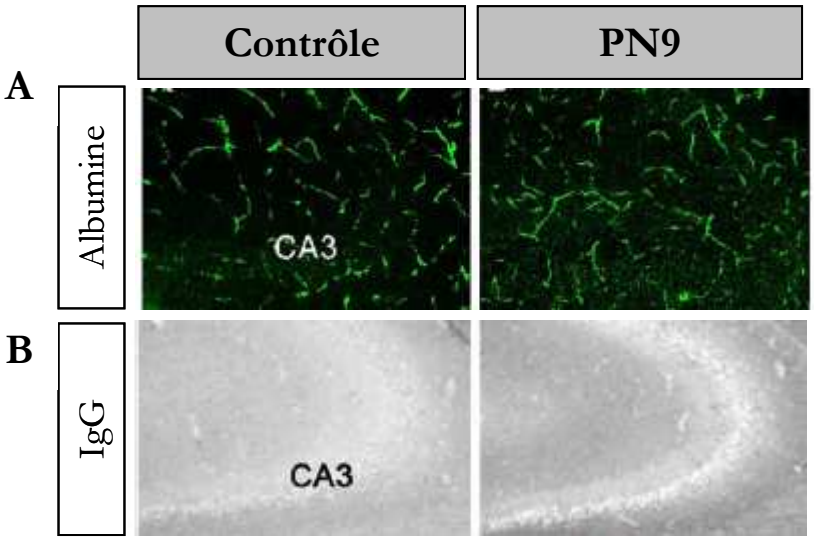


Figure 99 : Evaluation de la perméabilité de la BHE
(A) Marquage par albumine-FITC chez un rat contrôle et 1 semaine après un SE
(B). Marquage des IgGs chez un rat contrôle et 1 semaine après un SE
Marcon et al, 2009

A.1.3 Angiogenèse et expression de VEGF

La densité vasculaire a été évaluée par marquage de la laminine, et par la méthode de quantification décrite dans les chapitres précédents. Nous n'avons observé aucun remodelage vasculaire 1 semaine post-SE au niveau de l'hippocampe, de l'amygdale et du cortex fronto-pariétal.

L'expression de VEGF a été évaluée au niveau des neurones et des astrocytes. Une semaine post-SE, nous avons remarqué une augmentation de 55 % du marquage au niveau des neurones mais aucun changement au niveau des astrocytes. Cette augmentation significative de l'expression de VEGF n'induit pas d'angiogenèse ni de rupture de la BHE comme nous l'avons décrit ci-dessus.

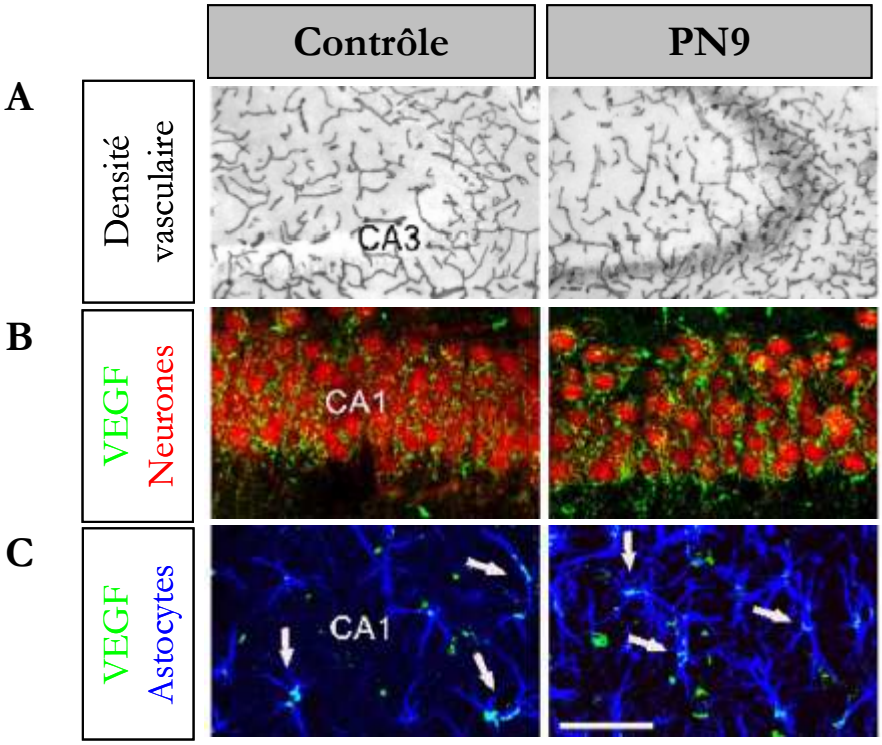


Figure 100 : Evaluation de la densité vasculaire et de l'expression de VEGF
(A) Marquage de la laminine chez un rat contrôle et 1 semaine post-SE.
Barre d'échelle 100µm
(B). Marquage de VEGF dans les neurones (NeuN) chez un rat contrôle et 1 semaine post-SE.
Barre d'échelle 50µm
(C). Marquage de VEGF dans les astrocytes (GFAP) chez un rat contrôle et 1 semaine post-SE.
Barre d'échelle 50µm

Marcon et al, 2009

En conclusion de ces résultats, nous pouvons affirmer qu'un SE n'induit ni remodelage vasculaire, ni inflammation chez des animaux à PN9

A.2 Après *status epilepticus* chez les rats PN21

A.2.1 Inflammation

A 1 semaine et à 4 mois post-SE, environ 60% des rats montrent une augmentation de l'expression de l'IL1-β dans les neurones et les astrocytes, alors que les autres ont la même expression que les contrôles. Il est intéressant de noter que les rats qui présentent un phénomène d'inflammation développent des crises spontanées, donc développent une épilepsie chronique (Figure 101).

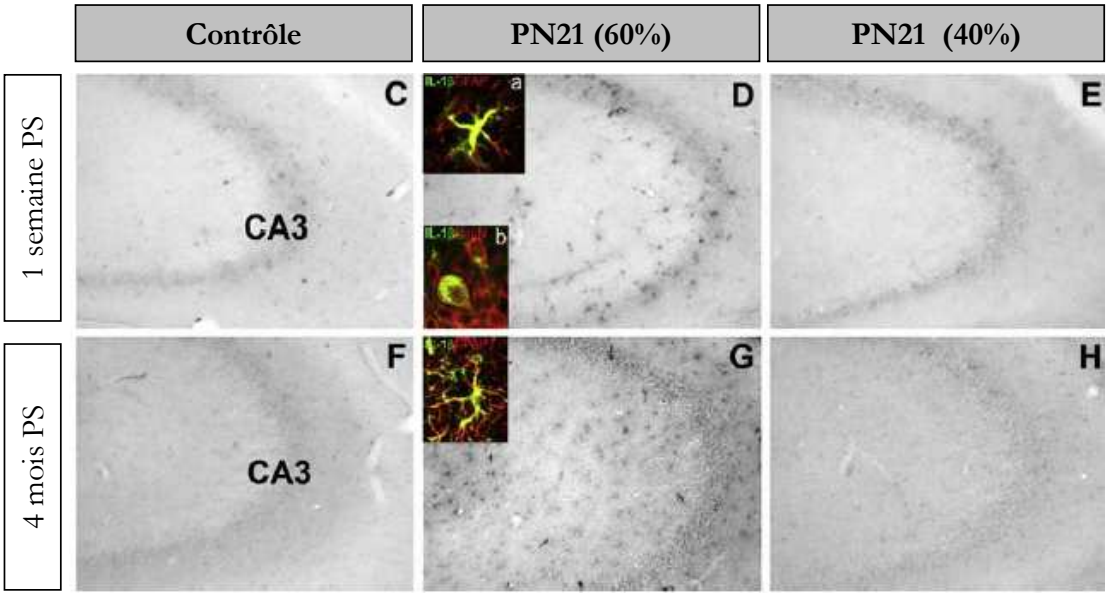


Figure 101 : Expression de l'IL1-β dans l'aire CA3 de l'hippocampe
chez des rats contrôles (C,F) et 1 semaine post-SE (D,E) ou 4 mois post-SE (G, H).
Révélation par peroxydase Barre d'échelle 100µm
Encadré image D:a) IL1β et astrocyte b) IL1β et neurone
Encadré image G : IL1β et astrocyte

Marcon et al, 2009

A.2.2 Perméabilité de la BHE

Contrairement aux rats PN9, une perméabilité de la BHE est visible chez les rats qui développent une épilepsie chronique. En effet, une extravasation d'albumine et d'IgGs est retrouvée. Les neurones positifs aux IgGs sont éosinophiles révélant une souffrance neuronale (Figure 102).

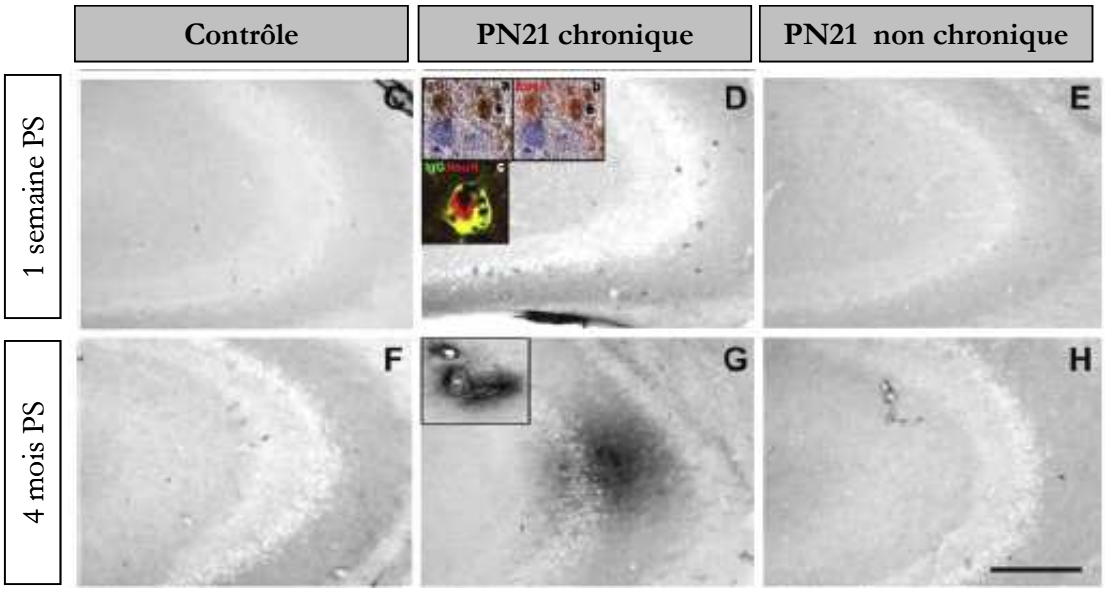


Figure 102 : Marquage des IgGs

chez des rats contrôles (C,F) et 1 semaine PS (D,E) ou 4 mois PS (G, H). Barre d'échelle 100µm

Encadré image D : Marquage IgG et eosine ou IgG et Neurone (NeuN)

Marcon et al, 2009

A.2.3 Angiogenèse et expression de VEGF

La densité vasculaire révèle une augmentation significative de 30 % environ par rapport aux contrôles, chez les rats développant une épilepsie chronique à 1 semaine et 4 mois post-SE. Comme pour l'IL-1β et les dommages de la BHE, les rats ne développant pas d'épilepsie chronique ne montrent aucune modification de la densité vasculaire par rapport aux contrôles (Figure 103-A, B).

Au niveau de l'expression de VEGF nous avons observé une augmentation de son expression dans les neurones chez tous les rats épileptiques ou non 1 semaine post-SE.. Cependant une expression plus élevée de VEGF dans les astrocytes est observée seulement dans le cas des animaux développant des crises chroniques (Figure 103-C,D).

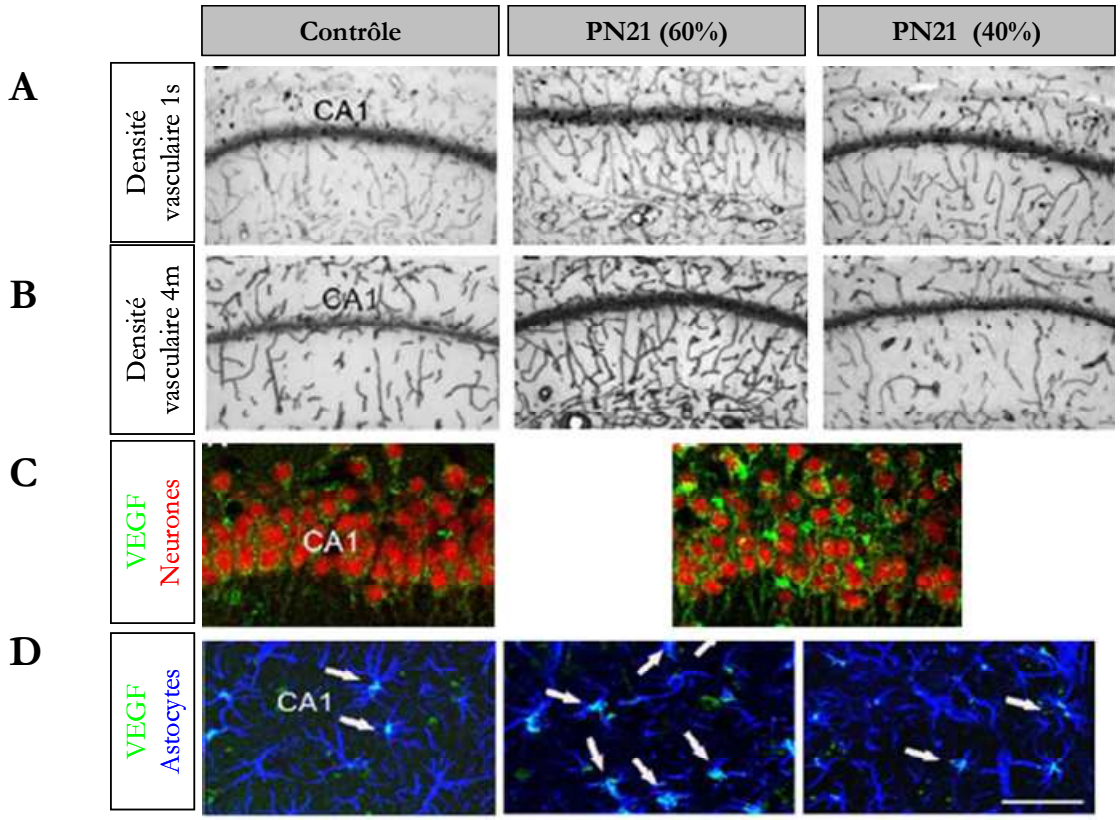


Figure 103 : Evaluation de la densité vasculaire et de l'expression de VEGF
(A) Marquage de la laminine chez un rat contrôle et 1 semaine post-SE. Barre d'échelle 100µm
(B) Marquage de la laminine chez un rat contrôle et 4 mois post-SE.. Barre d'échelle 100µm
(C). Marquage de VEGF dans les neurones (NeuN) chez un rat contrôle et 1 semaine post-SE.. Barre d'échelle 50µm
(D). Marquage de VEGF dans les astrocytes (GFAP) chez un rat contrôle et 1 semaine post-SE. Barre d'échelle 50µm

Marcon et al, 2009

Dans le cas des rats PN21 les résultats indiquent la présence d'inflammation et d'un remodelage vasculaire chez les rats qui développent une épilepsie chronique (60%).

Cette étude décrit un effet âge-dépendant dans le remodelage vasculaire, associé à l'inflammation et à la récurrence de crises spontanées, récapitulé ci-dessous.

	PN9	PN21
Angiogenèse	**NON**	**OUI**
Perméabilité BHE	**BHE immature** **Pas de protéines sériques dans les cellules**	**BHE mature** **Accumulation Albumine et IgG**
Inflammation	**NON**	**OUI**
Crises spontanées	**NON**	**OUI**

Ces résultats indiquent que ces 3 paramètres : inflammation, rupture de BHE et néo-vascularisation sont reliés les uns aux autres et participent à l'épileptogénèse.

Nous pensons qu'il existe des *mécanismes « anti-angiogéniques »* chez les jeunes rats pendant la maturation de la BHE. En effet, malgré une concentration importante de VEGF, il n'y a pas de neo-vascularisation.

De plus, ces jeunes animaux répondent à la pilocarpine par un *status epilepticus* « normal », mais ensuite, ils ne font pas de crises spontanées alors que la barrière est perméable. Ils ont donc la capacité de résister aux leucocytes et protéines sériques et ne développent ni inflammation, ni angiogenèse, ni épilepsie chronique, suggérant des *mécanismes de protection neuronale*.

B. Angiogenèse et rupture de la BHE dans un modèle d'hyperexcitabilité (sans épilepsie chronique)

En parallèle des études précédentes, nous avions recherché une angiogenèse et une rupture de la BHE dans un modèle d'hyperexcitabilité, non lésionnel et non chronique, chez le rongeur adulte : le kindling (embrasement) chimique (*cf chapitre épilepsie*). On l'induit par des injections répétées un jour sur deux de doses sub-convulsivantes de PTZ, un antagoniste du récepteur GABA-A. La première injection génère une crise de stade 1, caractérisée par des décharges courtes dans l'hippocampe, le thalamus et le cortex. Les injections suivantes induisent des crises qui s'allongent et s'aggravent progressivement avec des comportements épileptiques allant jusqu'au stade 5. L'arrêt des injections conduit à un arrêt des crises, aucune crise spontanée n'apparait chez ces animaux. L'étude morphologique ne révèle aucune lésion neuronale. Pour évaluer la progression

des crises nous avons mesuré la durée des crises et les stades comportementaux en regroupant les stades 2/3 et 4/5.

B.1 Etude de la densité vasculaire

La densité vasculaire a été quantifiée par la même technique que dans le modèle, mais sur plusieurs structures impliquées dans les crises : le thalamus, le cortex entorhinal, le cortex cingulaire et l'hippocampe.
La densité vasculaire augmente de façon significative dès le stade 1 dans le thalamus, l'hippocampe, les cortex cingulaire et entorhinal. Cette néo-vascularisation persiste dans les stades suivants pour le thalamus, les cortex entorhinal et cingulaire, alors que la densité vasculaire de l'hippocampe revient au niveau des contrôles. Nous avons remarqué que ces nouveaux vaisseaux sont très denses et tortueux, surtout au niveau du cortex entorhinal (Figure 104).

Dans certaines structures affectées par les crises et notamment l'hippocampe, on remarque une neo-vascularisation qui semble transitoire, contrairement au modèle pilocarpine.

Nous avons donc étudié par la suite l'expression du facteur angiogénique VEGF et VEGFR-2 ainsi que l'intégrité de la BHE, au niveau de l'hippocampe.

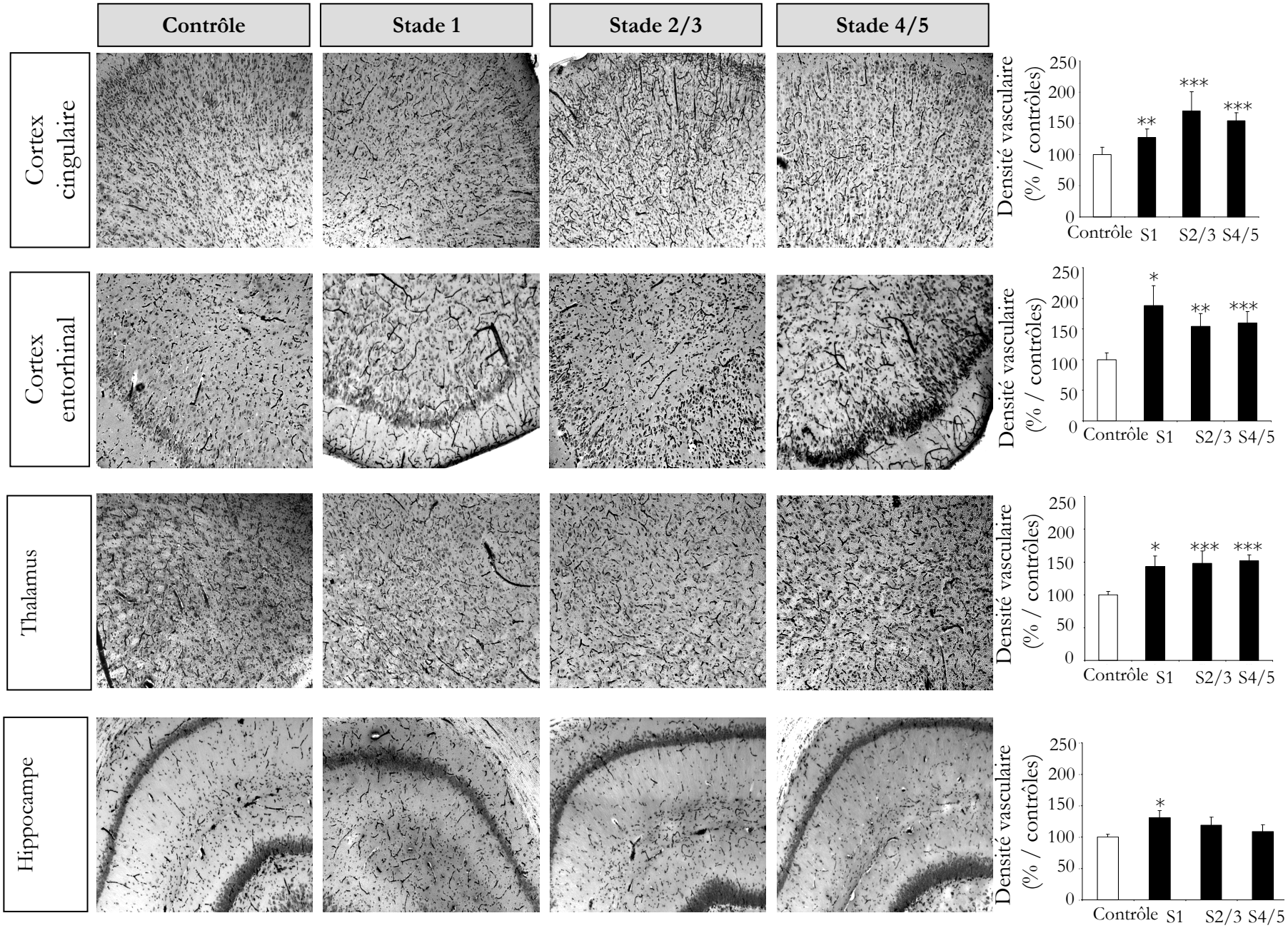


Figure 104 *: Vascularisation des différentes structures chez les rats kindling et contrôles*

B.2 Expression du VEGF

Chez les rats contrôles on observe une expression très faible de VEGF dans les neurones et absente au niveau des astrocytes. Au stade 1 de l'embrasement, les rats présentent une augmentation très importante de VEGF à la fois dans les neurones et les astrocytes et la quantification des western blots révèle une augmentation de plus de 150% par rapport aux contrôles. Dans les stades 2/3 ainsi que 4/5, seuls les neurones surexpriment le VEGF, mais beaucoup moins qu'au premier stade, car l'augmentation n'est que de +20% ou +50% respectivement (Figure 105).

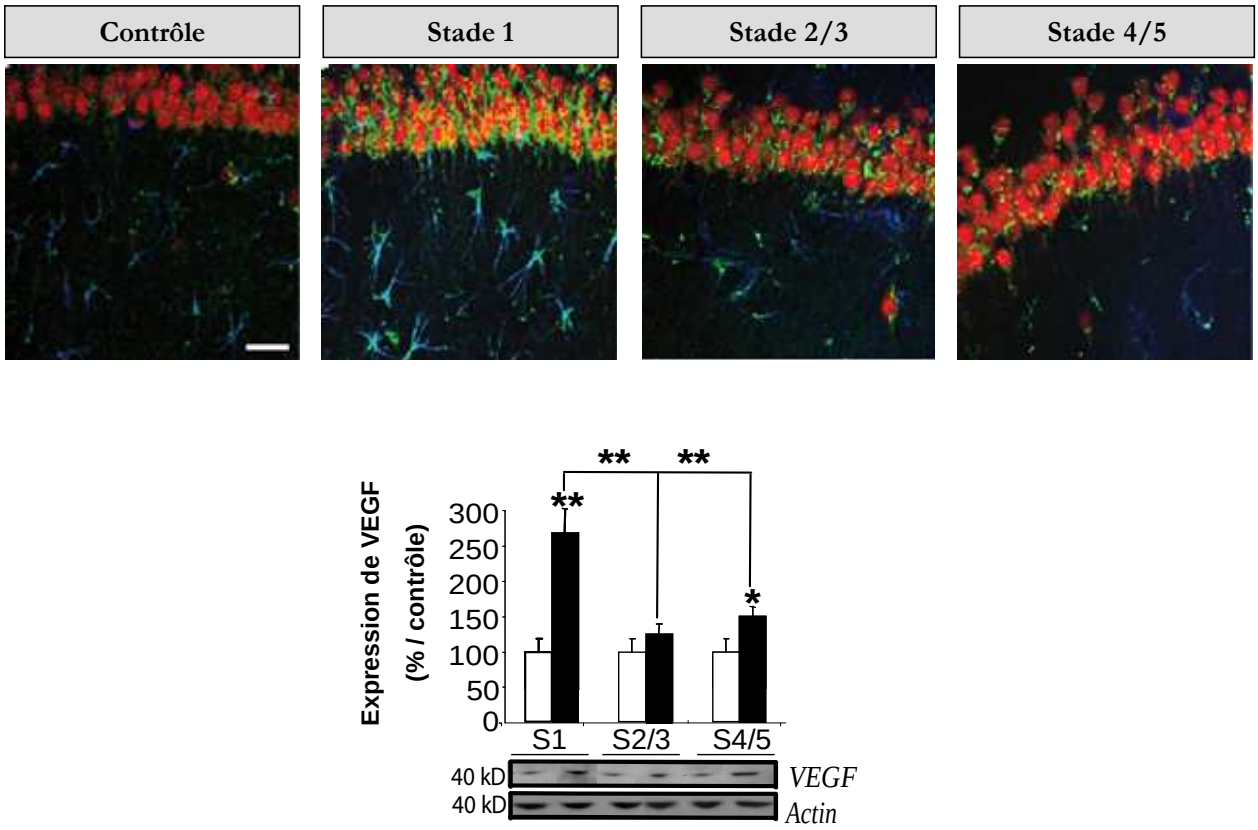


Figure 105: Expression de VEGF dans l'hippocampe au cours du kindling chimique.
Expression de VEGF par les neurones (NeuN) et les astrocytes (GFAP). Barre d'échelle 50µm
Quantification de l'expression de VEGF sur l'hippocampe de rats. Test statistique kruskall wallis (n= 5 pour chaque stade)

Nous avons remarqué un pic d'expression de VEGF dans l'hippocampe des rats « kindlés » maximal au stade où la densité vasculaire augmente.

Nous avons ensuite étudié l'expression de VEGFR-2.

B.3 Expression de VEGFR-2

L'expression de VEGFR-2 est évaluée par immunofluorescence et western blot. Les rats contrôles présentent un marquage de VEGFR-2 très faible au niveau des neurones et absent sur les vaisseaux. Chez les rats kindlés, nous avons observé une augmentation très nette du marquage VEGFR-2 au niveau des neurones à tous les stades. Cependant, il est intéressant de noter que l'expression de VEGFR-2 aux extrémités des microvaisseaux est seulement retrouvée au stade 1, car dans les stades suivants VEGFR-2 est absent des cellules vasculaires (Figure 106-A).

La quantification de l'expression du récepteur par western blot indique une augmentation significative, par rapport aux contrôles, à tous les stades du kindling : + 40% au stade 1 ; + 80% aux stades 2/3 et enfin 50% au stade 4/5 (Figure 106-B).

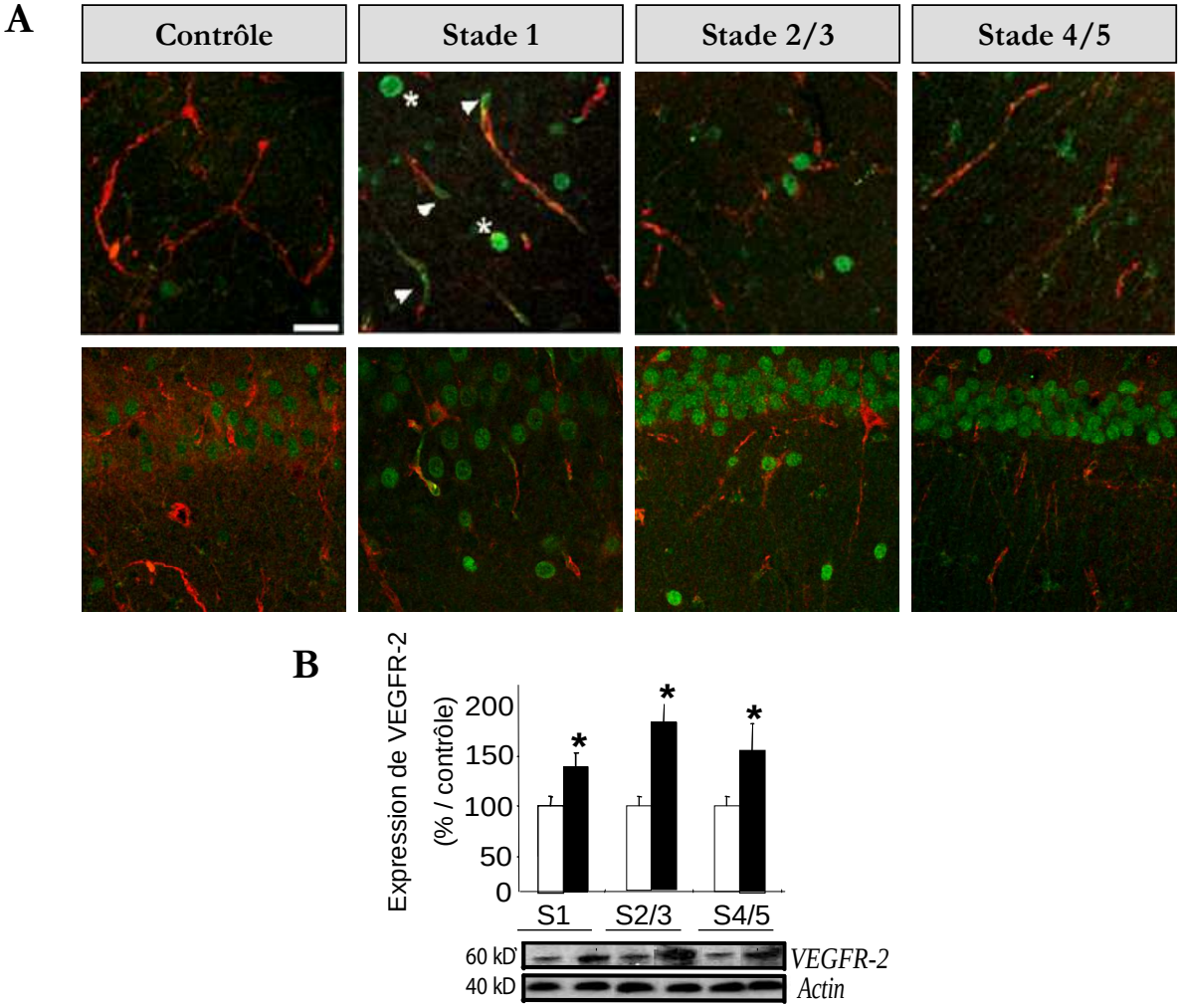


Figure 106 : Expression de VEGFR-2 dans l'hippocampe au cours du kindling chimique.

(A) Expression de VEGFR-2 par les cellules endothéliales (IB4). Barre d'échelle 50µm

(B) Quantification de l'expression de VEGFR-2 par western blot sur l'hippocampe de rats. Test statistique kruskall wallis (n= 5 pour chaque stade)

Contrairement à VEGF, l'augmentation de son récepteur est plus durable et stable.

Cependant l'immunofluorescence a révélé que cette surexpression constante concerne essentiellement les neurones, alors que dans les vaisseaux l'expression de VEGFR-2 est transitoire au stade 1.

Connaissant le rôle crucial de VEGF et VEGFR-2 dans la rupture de la BHE, nous avons alors étudié l'intégrité de la BHE dans ce modèle *in vivo* au niveau de l'hippocampe.

B.4 Intégrité de la BHE dans l'hippocampe

L'intégrité de la BHE a été évaluée par l'expression de la protéine transmembranaire des jonctions serrées l'occludine et la protéine cytoplasmique ZO-1.
La quantification de l'occludine par western blot ne révèle aucune modification significative de son expression, malgré une légère diminution au stade 1 et une augmentation au stade 4/5. De la même façon aucun changement notable n'est observé au niveau de la protéine ZO-1, si ce n'est une légère augmentation au stade 1 (Figure 107-A).
Bien que le blot ne démontre aucune modification de l'expression, la localisation de la protéine ne peut être modifiée. Nous avons donc observé la localisation de la protéine ZO-1 au niveau des vaisseaux par immunofluorescence. Chez les rats contrôles, la protéine ZO-1 est présente sur tout au long des vaisseaux. Au stade 1 et 2/3 certains vaisseaux montrent une barrière intacte alors que d'autres présentent à certains endroit une absence de la protéine ZO-1, indiquant une possible internalisation de la protéine. Au stade 5 on retrouve la présence de ZO-1 tout au long des vaisseaux, indiquant l'intégrité de la BHE. Cette réparation de l'intégrité des TJs est surprenante, car les crises au stade 5 sont intenses et de longue durée (Figure 107-B).

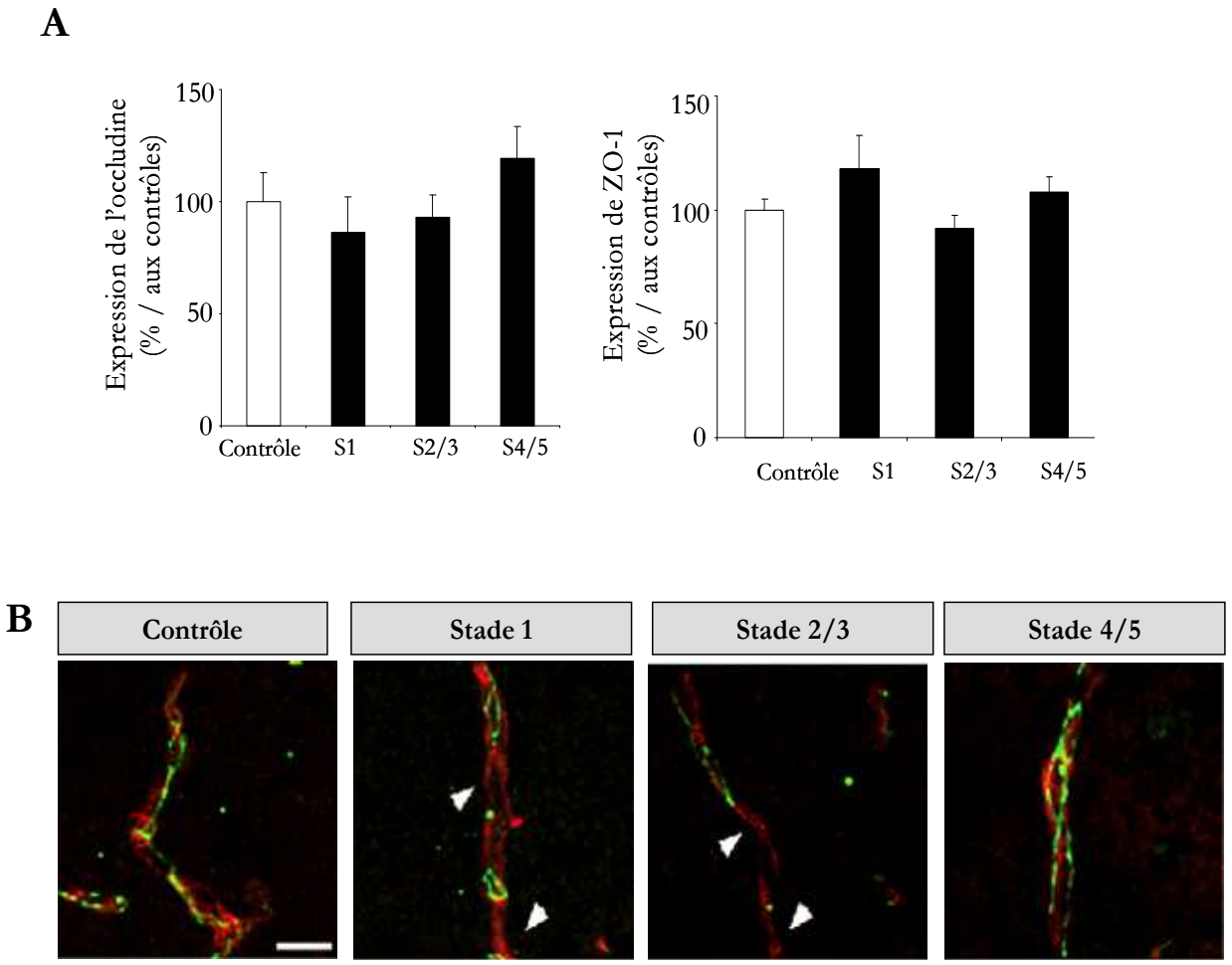


Figure 107 : Intégrité de la BHE de l'hippocampe au cours du kindling chimique.

(A) Quantification de l'expression de l'occludine et de ZO-1 par western blot sur de rats. Test statistique kruskall wallis (n= 5 pour chaque stade)

(B) Expression de ZO-1 par les cellules endothéliales (IB4). Barre d'échelle 10µm

Ces résultats montrent que la BHE dans ce modèle est rompue transitoirement dans les premiers stades sans dégradation mais avec désassemblage des protéines des jonctions serrées. Cependant cette perte de l'intégrité de la BHE n'est pas permanente contrairement aux modèles chroniques.

B.5 Intégrité de la BHE et expression de VEGF dans les autres structures

Nous avons évalué l'expression de VEGF ainsi que ZO-1 par immunofluorecence dans les autres structures où la densité vasculaire augmente significativement. Les résultats préliminaires sont présentés dans le tableau ci-dessous

	CORTEX CINGULAIRE		CORTEX ENTORHINAL		THALAMUS	
	VEGF NeuN GFAP	ZO-1 IB4	VEGF NeuN GFAP	ZO-1 IB4	VEGF NeuN GFAP	ZO-1 IB4
Contrôle	*Niveau de base dans les neurones*	*BHE intègre*	*Niveau de base dans les neurones*	*ZO-1 le long des vaisseaux*	*Niveau de base dans les neurones*	*BHE intègre*
S1	↗ *dans les neurones*	*BHE intègre*	↗ *dans les neurones*	*BHE rompue*	↗ *dans les neurones*	*Perte de ZO1*
S2/3	↗ *dans les neurones*	*Perte de ZO1*	↗ *dans les neurones*	*Quelques pertes de ZO-1*	↗ *dans les neurones*	*Perte de ZO1*
S4/5	↗ *dans les neurones*	*BHE intègre*	↗ *dans les neurones et les astrocytes*	*BHE intègre*	↗ *dans les neurones*	*Perte de ZO1*
Conclusion	**Expression neuronale augmentée**	**Rupture puis réparation de la BHE**	**Expression neuronale et astrocytaire augmentée**	**Rupture puis réparation de la BHE**	**Expression neuronale augmentée**	**Perte permanente de l'intégrité de la BHE**

Nous avons constaté dans les cortex entorhinal et cingulaire un profil similaire à celui de l'hippocampe pour l'expression du VEGF et l'intégrité de la BHE. Seul le thalamus diffère, avec une BHE rompue à tous les stades.

Les résultats obtenus sur ces animaux qui ne développent pas de crises spontanées, montrent un pic d'expression de VEGF et VEGFR-2 et une rupture de la BHE transitoire pendant les premiers stades, dans la plupart des structures atteintes par le kindling chimique.
Cette étude renforce l'hypothèse d'un lien entre la persistance de la rupture de BHE et la chronicité de l'épilepsie.
Par ailleurs, le décours de ce remodelage vasculaire suggère qu'après les premières crises qui perméabilisent la BHE, des facteurs protecteurs réparent ou consolident la BHE qui résiste ensuite aux autres crises, bien plus sévères. Ces processus évoquent le phénomène de la tolérance vasculaire décrit dans l'ischémie (Kunz, A., *et al. - 2007*).

Nous avons suggéré précédemment que des mécanismes anti-angiogéniques et neuroprotecteurs empêchent le développement de crises chroniques chez les jeunes animaux dont la BHE est immature.
Ces derniers résultats concernant un modèle d'excitabilité sans crises spontanées chez l'adulte laissent entrevoir une sorte de pré-conditionnement qui permet une tolérance vasculaire.

Des investigations à grande échelle, qui compareraient l'expression des facteurs angiogéniques ou des protéines de jonction serrées entre le modèle « pilocarpine » et le modèle « kindling », pourraient identifier les molécules protectrices ou réparatrices et suggérer de nouvelles stratégies qui, en renforçant la BHE, pourraient réduire l'épileptogenèse.

C. Réparation de la BHE : quelles cibles thérapeutiques ?

Dans le modèle lésionnel *in vitro* (cf.chapitre précédent) l'administration de l'anticorps neutralisant le VEGF a permis de reconstruire les jonctions serrées de la BHE préalablement rompue. Malgré l'intérêt d'un tel résultat, nous ne pouvons pas le proposer comme une thérapie anti-épileptique, car l'inhibition globale du système VEGF/VEGFR-2 apporterait beaucoup d'effets secondaires dangereux. En effet, certaines voies de signalisation de VEGFR-2 ont des effets bénéfiques qui sont particulièrement importants dans l'épilepsie. Entre autres, la voie IP3, par l'activation de la NOS endothéliale, adapte le débit sanguin aux demandes métaboliques des neurones et ce couplage neuro-vasculaire est crucial pendant les crises (Rondouin, G., *et al. - 1993*). Enfin,

l'action neuro-protectrice du VEGF est indispensable pendant les crises (Nicoletti, J. N., *et al.* - *2008*) et passe par la voie PI3kinase qui active des cascades anti-apoptotiques.

C'est pour ces différentes raisons que nous avons envisagé de nous focaliser maintenant sur le système des angiopoiétines et leur récepteur Tie-2. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'Ang1 est nécessaire pour la stabilisation des vaisseaux alors que l'Ang2, qui potentialise les effets du VEGF, déstabilise la vascularisation.

Pour définir de nouvelles cibles thérapeutiques, nous avons d'abord comparé l'équilibre Ang1/Ang2 entre dans les 2 modèles *in vitro*, l'un avec dégradation de la BHE (kainate) et l'autre avec « réparation spontanée de la BHE » (bicuculline). Puis nous avons ajouté de l'Ang1 recombinante après les crises et étudié ces effets sur l'intégrité de la BHE.

C.1 Equilibre Ang1/Ang2

Nous avons évalué l'expression de ces 2 facteurs à différents temps après les crises par western blot (Figure 108).

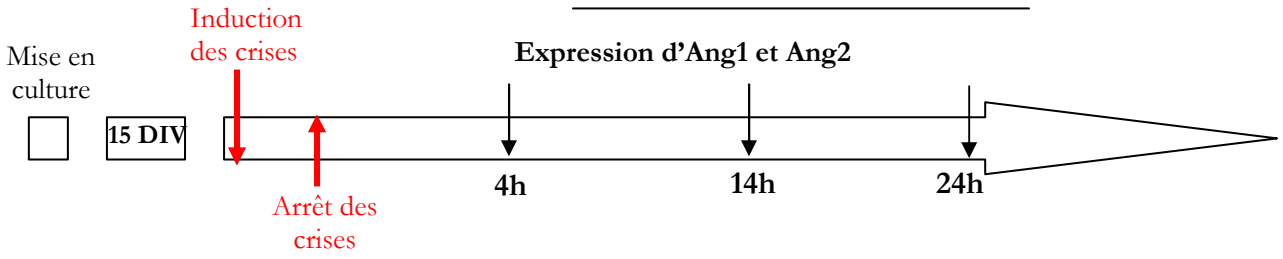


Figure 108 : Protocole expérimental pour l'étude de l'expression d'Ang1 et 2

C.1.1 Expression des Ang1 et Ang2 dans le modèle kainate

Nous avons constaté une importante diminution de l'expression d'Ang1 (- 80%) 4 h PS et reste significativement diminuée 14h et 24h PS (-40 et -30% respectivement) (Figure 109-A). L'Ang2, au contraire, a des valeurs similaires aux contrôles à 4h et 14h PS mais présente une augmentation très importante 24 h après les crises (+124%) (Figure 109-B).

L'angiogénèse et la stabilité des vaisseaux sont régulées par un équilibre complexe entre activateurs et inhibiteurs. Le couple Ang1/Ang2 en est un exemple parfait (*cf chapitre 3 BHE*).

Nous avons donc calculé le rapport Ang1/Ang2 à partir des différentes valeurs obtenues ci-dessus. Nous observons une forte diminution du rapport à 4h PS (à cause de la forte dégradation d'Ang1) et à 24 h PS (dûe à l'augmentation massive d'Ang2) (Figure 109-C).

Nous avons ensuite cherché si la chute d'Ang1 était la conséquence d'un arrêt de transcription ou d'une dégradation de la protéine elle-même. Pour cela, nous avons étudié aux mêmes temps l'ARNm de l'Ang1 par qPCR. A 4 h PS il n'y a aucune diminution de l'ARNm indiquant une possible dégradation de la protéine. L'ARNm est fortement diminué (-40%) à 14 h PS, temps où l'équilibre Ang1/Ang2 semble stable. Cependant, à 24 h PS malgré une augmentation de l'ARNm on observe un déséquilibre du ratio Ang1/Ang2 en faveur d'Ang2, pouvant révéler soit un arrêt de la traduction soit une dégradation de la protéine (Figure 109-D).

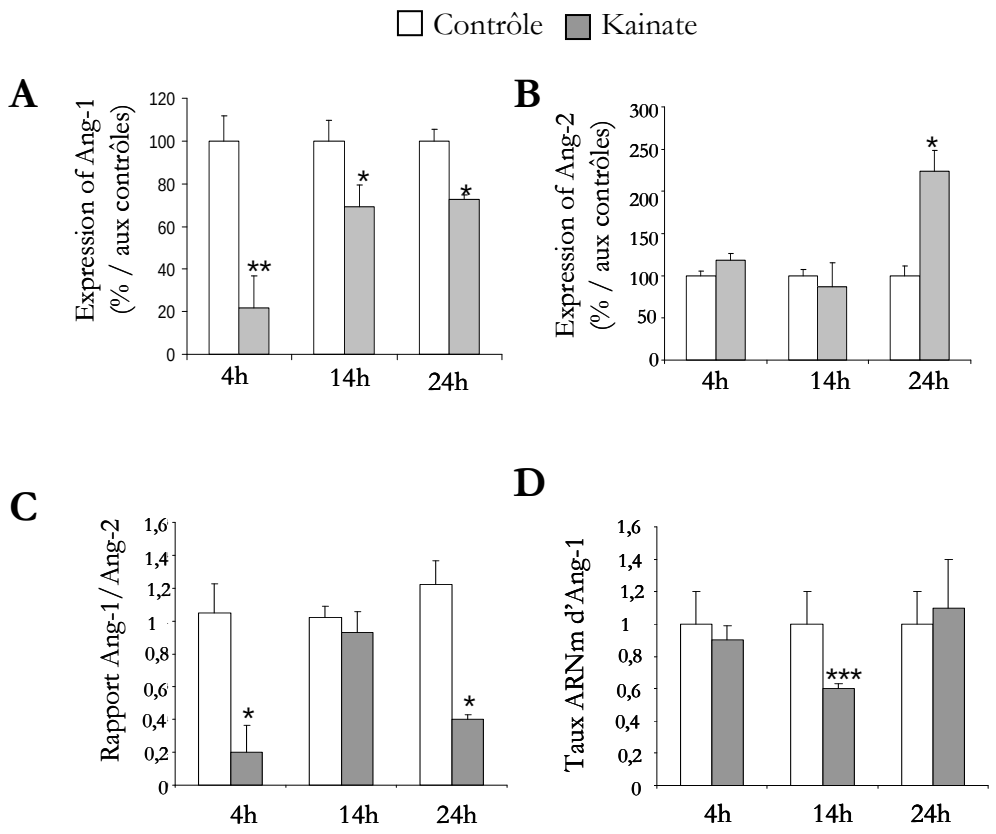


Figure 109 : Expression d'Ang1 et Ang2 dans le modèle kainate
(A-B) Expression de la protéine Ang1 et Ang2 évaluée par western blot.
(C) Ratio entre Ang1 et Ang2
(D) Taux d'ARNm évalué par qRT-PCR

C.1.2 Expression des Ang1 et Ang2 dans le modèle bicuculline

Contrairement au modèle kainate, une diminution significative de l'expression d'Ang1 a lieu seulement à 4 h PS. L'expression d'Ang1 revient à la normale 24 h PS. Au niveau d'Ang2 l'expression est augmentée à 4 h PS puis diminue et retourne au niveau des contrôles (Figure 110-A & B). Le temps 4 heures où nous retrouvons une diminution d'Ang1 et une augmentation de la 2 indiquerait sans doute le départ des phénomènes d'angiogenèse que nous avons décrit dans le chapitre précédent.

Le ratio Ang1/Ang2 est en faveur d'Ang2 seulement à 4 h PS. Même si on observe un léger déséquilibre du ratio par la suite, cette diminution n'est pas significative (Figure 110-C).

De la même façon que dans le modèle kainate, nous avons regardé par qRT-PCR l'évolution de l'ARNm après les crises. Nous n'avons observé aucune modification à 4 h PS, cependant l'ARNm est fortement diminué 14 h 24 h PS (- 60% et -40% respectivement) qui pourraient se traduire par la production de la protéine dans le modèle bicuculline (Figure 110-D).

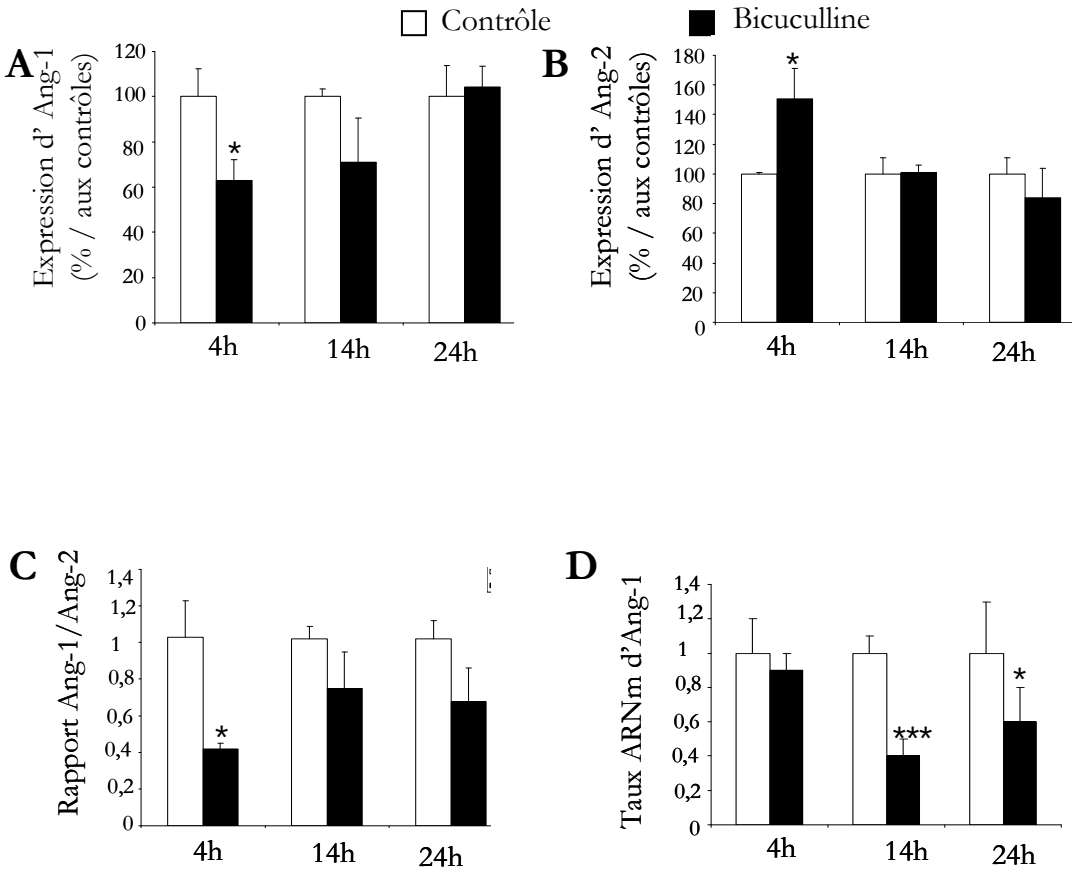


Figure 110 : Expression d'Ang1 et Ang2 dans le modèle bicuculline
(A-B) Expression de la protéine Ang1 et Ang2 évaluée par western blot.
(C) Ratio entre Ang1 et Ang2
(D) Taux d'ARNm évalué par qRT-PCR

Nous montrons donc ici un déséquilibre du ratio Ang1/Ang2 dans le modèle kainate, qui n'est pas retrouvé dans le modèle bicuculline. Cette différence pourrait expliquer, respectivement la persistance ou la réversibilité de la rupture de BHE, dans ces modèles.

Cette étude nous incite à rééquilibrer le ratio dans le modèle kainate, en administrant de l'Ang1 recombinante après les crises et d'évaluer un éventuel effet réparateur sur la BHE.

C.2 Est-ce qu'une augmentation de la concentration d'Ang1 peut réparer la BHE ?

Pour répondre à cette question nous avons appliqué l'Ang1 recombinante (400ng/ml) 4 heures après les crises et ensuite évalué l'expression de ZO-1 24 h PS (même protocole que pour la neutralisation du VEGF).

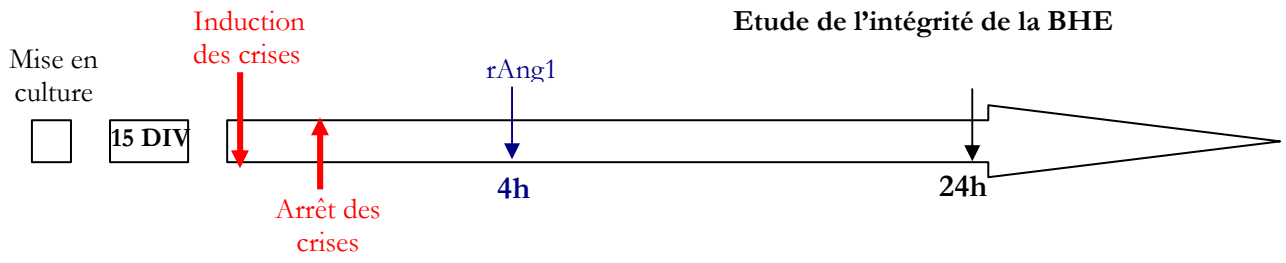


Figure 111 : Protocole expérimental de l'application de rAng1

L'application d'Ang1 n'induit aucune modification de l'intégrité de la BHE sur les cultures contrôles : aucune différence n'a été notée en western blot et en immunofluorescence.
Dans les cultures traitées par le kainate, la perte de ZO-1 est compensée en présence de rAng1 (western blot) et son expression à la BHE est similaire à celle des cultures contrôles (Figure 112).

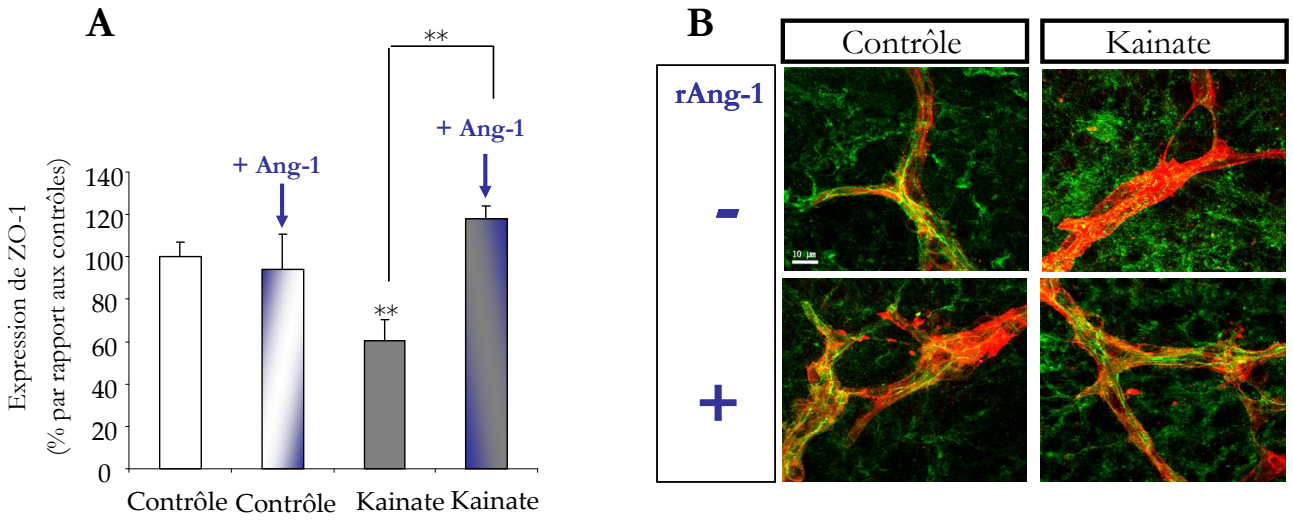


Figure 112 : Effet de la rAng1 sur l'expression de ZO-1 à la BHE après des crises

Quantification de l'expression de ZO-1 par western blot. Exprimée en % par rapport aux contrôles.

(A) Localisation de ZO-1 sur les vaisseaux (laminine). Barre d'echelle 10µm.

Ces résultats indiquent clairement que l'Ang1 administrée après les crises est capable de réparer la BHE dégradée par les crises.

La suite logique de ces travaux est le passage à l'*in vivo*. Nous voulons tester sur le modèle d'épilepsie chronique (SE induit par la pilocarpine) soit directement de l'Ang1 recombinante, soit des molécules agissant sur le système Ang1/Ang2 en faveur d'Ang1.

Nous pourrons alors évaluer l'impact du traitement sur l'occurrence des crises spontanées et sur leurs paramètres de durée, fréquence et sévérité par enregistrements EEG/Vidéo. Ensuite nous évaluerons l'intégrité et la perméabilité de la BHE.

En conclusion de ce chapitre, nous retiendrons que :

L'inflammation et l'angiogenèse sont concomitantes et, très probablement, elles s'auto-entretiennent, notamment via l'interleukine-1β qui induit VEGF.

Il existe un lien entre l'angiogenèse et l'épilepsie chronique, si l'on compare le modèle « pilocarpine » aux modèles « kindling » et « rat immature ».

Dans ces modèles « non chroniques », nous soupçonnons des processus de protection qui consolident ou réparent la BHE et qui, ainsi peuvent prévenir les conséquences de l'immaturité ou la perméabilité de la BHE.

D'autres facteurs angiogéniques participent à la rupture de BHE après les crises dont les angiopoiétines Ang1 et Ang2, qui sont en compétition pour activer ou inhiber leur récepteur, joue un rôle important dans la perméabilité de la BHE.

Nous pouvons alors compléter le schéma récapitulatif :

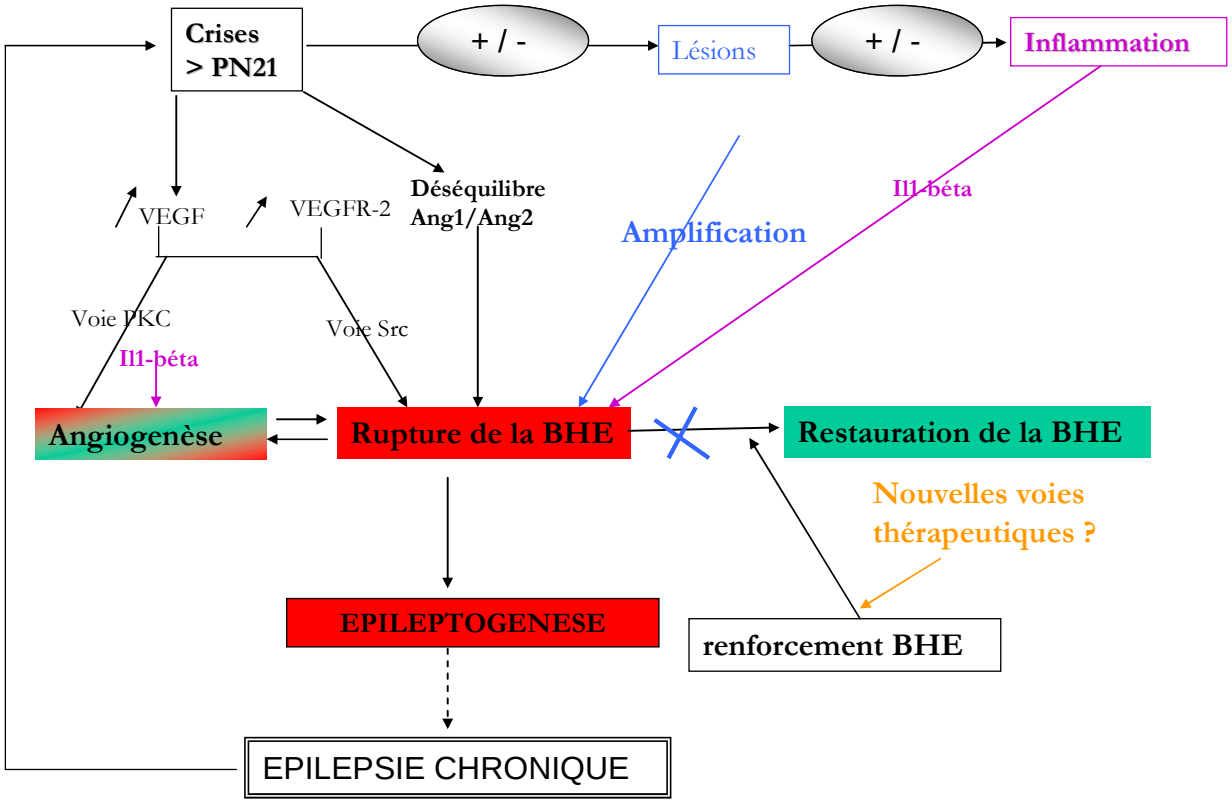


Figure 113 : Schéma du remodelage vasculaire après une crise (3)

DISCUSSION

1ère partie : Angiogenèse dans les foyers épileptiques

Dès la fin du 19ème siècle Bratz, puis Spielmeyer en 1927 avaient décrit des anomalies morphologiques de la vascularisation des foyers épileptiques avec sclérose hippocampique et, logiquement, ils les supposaient responsables de l'épilepsie. Plus tard, d'autres auteurs relatèrent aussi des dysfonctionnements vasculaires dans les foyers lésionnels (Eid, T., *et al. - 2005,* Van Vliet, E. A., *et al. - 2007*). Ces remodelages vasculaires n'ayant jamais été rapportés dans des foyers non lésionnels, ils étaient considérés comme une conséquence de la sclérose.
Dans notre étude, nous avons observé une néo-vascularisation chez des patients adultes atteints d'ELT, quelles que soient leurs étiologies.

Nous rapportons donc pour la première fois un substrat morphologique qui affecte toutes les formes d'ELT. L'angiogenèse pathologique pourrait expliquer les altérations de la barrière hémato-encéphalique, reconnue comme une condition épileptogène, ainsi que les œdèmes ou l'hypoperfusion intercritique décrits dans les foyers mais jamais expliqués. La compréhension des mécanismes et des conséquences de cette angiogenèse passe par les étapes suivantes.

Origine de l'angiogenèse dans les foyers épileptiques

L'angiogenèse aberrante que nous avons observée est indépendante des lésions ou de la gliose, mais elle est corrélée à la fréquence des crises. Des remaniements vasculaires semblables ont été retrouvés dans un modèle *in vivo* d'épilepsie limbique chez le rongeur.
Nous avons alors émis l'hypothèse que l'angiogenèse est induite par les crises elles-mêmes. En effet, dans divers modèles *in vivo*, les crises, lésionnelles ou non, induisent un processus angiogénique (Croll, S. D., *et al. - 2004,* Hellsten, J., *et al. - 2005,* Newton, S. S., *et al. - 2003,* Newton, S. S., *et al. - 2006*).
Sur nos modèles *in vitro*, lésionnels ou non, nous avons rapporté une augmentation de la densité vasculaire après les crises.
Dans les foyers chroniques, humains et animaux, on constate l'expression persistante de facteurs angiogéniques et la présence de nombreux progéniteurs endothéliaux, suggérant une réactivation récurrente du processus angiogénique par les crises spontanées.

Nos résultats, par l'utilisation de plusieurs modèles, révèlent que la crise épileptique est suffisante pour induire un processus angiogénique.

Importance du couple VEGF/VEGFR-2

Nous avons suggéré que la première étape de cette angiogenèse est l'induction du VEGF.

En effet, plusieurs études étayaient notre hypothèse, décrivant une surexpression massive et rapide du VEGF dans les neurones après des crises expérimentales, brèves ou durables. Par exemple, l'équipe de Sharfman a montré une expression rapide de VEGF dans les astrocytes et les neurones après un *status epilepticus* (SE), attribuée à l'hypoxie et/ou à l'excitotoxicité, par l'activation de HIF-1 facteur de transcription du VEGF (Croll, S. D., *et al. - 2004,* Pages, G., *et al. - 2005,* Semenza, G. L. - *2000*). Cependant, une surexpression de VEGF a aussi été reportée après de brefs électrochocs (Newton, S. S., *et al. - 2003,* Newton, S. S., *et al. - 2006*), impliquant d'autres facteurs de transcription rapidement activés par les MAPkinases ou encore les cytokines (Pages, G., *et al. - 2005*).

In vivo ou *in vitro,* nous avons montré une augmentation très rapide de l'expression de VEGF après une crise, majoritairement dans les neurones et aussi dans les astrocytes. La neutralisation du VEGF et l'application de VEGF recombinant sur nos modèles *in vitro* ont permis de démontrer que ce facteur est **nécessaire et suffisant** pour induire l'angiogenèse après les crises.
Dans les foyers chroniques chez l'animal et l'homme, le VEGF reste surexprimé. Dans le modèle animal lésionnel et dans les ELT avec sclérose hippocampique, nous avons constaté que les astrocytes « prennent le relais » pour la synthèse du VEGF quand les neurones ont disparu.

Les effets du VEGF passent majoritairement par VEGFR-2, qui est rapidement surexprimé par les neurones et les cellules endothéliales après une crise.

Son activation déclenche l'activation de plusieurs voies de signalisation qui régulent de nombreux phénomènes dont la **neuroprotection, l'angiogenèse**, et la **perméabilité vasculaire** (Holmes, K., *et al. - 2007*).
VEGFR-2 exerce un effet anti-apoptotique par la voie de survie ***PI3K/Akt***. Dans l'ischémie, cette voie se révèle bénéfique pour les neurones (Kilic, E., *et al. - 2006*), et nos expériences confirment ce rôle neuro-protecteur après les crises épileptiques. VEGFR-2 est aussi impliqué par l'activation de la ***PKC*** dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales au cours

de l'angiogenèse après les crises. Les voies impliquées dans la perméabilité seront abordées dans la deuxième partie.

Il est très probable que d'**autres facteurs** participent à la neo-vascularisation du foyer épileptique : les molécules d'adhésion comme les intégrines ou VE-cadherine, les molécules de guidance comme les éphrines, ou d'autres facteurs comme le FGF, le PDGF, participent à l'angiogenèse (Otrock, Z. K., *et al. - 2007*) Les cytokines et les chimiokines sont massivement exprimées dans les foyers épileptiques, certaines étant pro-angiogéniques (IL-1β active l'induction du VEGF) et d'autres recrutant les leucocytes ou les progéniteurs endothéliaux (Keeley, E. C., *et al. - 2008,* Vezzani, A. - *2005,* Vezzani, A., *et al. - 2005*)

Nos travaux montrent aussi une dérégulation importante de l'équilibre Ang1/Ang2 qui pourrait jouer un rôle important dans l'angiogenèse. En effet, la présence d'Ang2 potentialise l'effet angiogénique du VEGF (Zhu, Y., *et al. - 2005*).

Malgré l'importance des facteurs que nous venons d'énumérer, VEGF semble être le primum movens de l'angiogenèse induite par les crises. En effet, il précède et induit le recrutement leucocytaire et l'inflammation, en activant ICAM-1 et MUP-1 (major urinary protein 1) (Croll, S. D., et al. - 2004) ; il induit l'expression du récepteur des angiopoiétines Tie2 (Singh, H., et al. - 2009).
Ces voies activées, ensuite, renforcent les processus angiogénique initié par VEGF.

2ème partie : Conséquence d'une angiogenèse pathologique : dégradation de la BHE

Dans l'ischémie cérébrale, l'angiogenèse est bénéfique par la revascularisation de la zone affectée. Cependant, la formation de nouveaux capillaires nécessite une perméabilité vasculaire. Selon la concentration des facteurs angiogéniques et l'intensité de l'ouverture de la BHE, ce processus réparateur peut devenir délétère (Hayashi, T., *et al. - 2006*).

De la même façon, dans les ELT, la néo-vascularisation est associée à une perméabilité de la BHE. Nous avons montré dans les foyers chroniques humains une perte d'intégrité de la BHE évaluée par l'expression de la protéine de jonctions serrées ZO-1. La dégradation des jonctions serrées est corrélée à une augmentation de la perméabilité vasculaire, décrite dans l'ischémie (Sandoval, K. E., *et al. - 2008*). Dans les foyers épileptiques humains, la perméabilité est évaluée par le marquage des protéines sériques. Chez les animaux épileptiques, nous l'avons décelée dès le SE jusqu' à la phase chronique.

Le bourgeonnement des capillaires et le recrutement des progéniteurs circulants, ont pour rôle de reconstruire un réseau vasculaire fonctionnel. Cependant, un excès de facteurs angiogéniques empêche la maturation des microvaisseaux et la perméabilité persiste (Saunders, N. R., *et al. - 2000*).

La crise est suffisante pour dégrader la BHE

Une étude indirecte sur les effets de l'hyperthermie décrit un rôle important des crises dans la perméabilité de la BHE. En effet, l'hyperthermie induite chez des rats peut déclencher des crises et seuls les rats qui ont convulsé montrent une rupture de la BHE (Ilbay, G., *et al. - 2003*).

Avec des modèles plus classiques d épilepsies limbiques, l'équipe de J. Gorter a prouvé que le degré de perméabilité de la BHE était corrélé à la fréquence des crises (Van Vliet, E. A., *et al. - 2007*).

Cependant, un lien direct entre crises et rupture de BHE n'a jamais été clairement démontré.

Notre étude *in vitro* prouve qu'une crise est suffisante pour altérer l'intégrité de la BHE. En revanche, elle n'est pas suffisante pour maintenir une rupture prolongée de la barrière, car seuls les modèles lésionnels, *in vivo* comme *in vitro,* induisent une dégradation persistante de la BHE.

De simples crises sont donc suffisantes pour induire une rupture de BHE transitoire, qui constitue la première phase du processus angiogénique dans les foyers épileptiques.

L'activation de VEGF/VEGFR-2, par la voie src, est nécessaire et suffisante pour dégrader la BHE.

Plusieurs études confirment le rôle crucial du couple VEGF/VEGFR-2 dans la perméabilité vasculaire et particulièrement celle de la BHE.
L'activation de ce couple agit au niveau des protéines des jonctions serrées. Déjà en 2004, Harhaj avait proposé un rôle de VEGFR-2 dans l'internalisation de ZO-1 et de l'occludine. De plus, un article récent décrit le VEGF comme l'acteur principal de la perte de la claudine-5 et de l'occludine dans le cas d'encéphalites (Argaw, A. T., *et al. - 2009*).
Cependant, la rupture de la BHE passe aussi par des métalloprotéinases, notamment MMP2 et 9. Or VEGF est impliqué dans l'activation de MMP9 (Hayashi, T., *et al. - 2006*).
Dans nos modèles *in vitro,* nous avons constaté que la neutralisation du VEGF annule la perte de ZO-1 après les crises, alors que le VEGF recombinant, au contraire, provoque la perte de cette protéine.

Parmi les voies de signalisation de VEGFR-2, détaillées précédemment, la voie src est la plus spécifique de la perméabilité vasculaire, par un effet sur les jonctions adhérentes (internalisation de la VE-cadhérine) et aussi sur les jonctions serrées (phosphorylation de l'occludine) (Gavard, J., *et al. - 2006,* Scheppke, L., *et al. - 2008,* Takenaga, Y., *et al. - 2009*).
Dans notre modèle, l'inhibition de la voie src protège de la perte de ZO-1 induite par les crises, confirmant le rôle important de cette voie dans l'intégrité de la BHE.

La surexpression de VEGF est donc suffisante pour induire une rupture de la BHE transitoire mais pas permanente. La mort neuronale, suivie de gliose et d'inflammation pourrait amplifier la rupture de la BHE par divers facteurs comme les cytokines sécrétées par les astrocytes et la microglie. L'IL-1β, fortement exprimée dans les foyers épileptiques (Vezzani, A., *et al. - 2007*) est capable de dégrader les jonctions serrées par l'activation directe ou via VEGF des MMP9 des neutrophiles (Mccoll, B. W., *et al. - 2008*). De plus, une étude très récente montre que le blocage de l'inflammation par un antagoniste de l'IL-1β diminue le SE et les dommages de la BHE (Marchi, N., *et al. - 2009*). D'autres cytokines sécrétée par la microglie ou les astrocytes dans les foyers épileptiques comme l'IL-6, le TNF-α ou encore l'IL-12 induisent aussi une perméabilité de la BHE (Oby, E., *et al. - 2006*). On peut aussi citer le stress oxydatif, présent dans les foyers épileptiques, qui active aussi les métalloprotéinases 2 et 9 (Yu, F., *et al. - 2008*).

Enfin, le ratio Ang1/Ang2 a un rôle crucial dans cette rupture : Ang1 stabilise les vaisseaux alors qu'Ang2 potentialise les effets de VEGF sur la rupture de la BHE (Zhu, Y., *et al. - 2005*).

Nos résultats, confrontés à ceux de la littérature indiquent que le VEGF sécrété après les crises est l'acteur essentiel de la rupture de la BHE, mais que d'autres facteurs sont nécessaires pour que la dégradation persiste. Ces facteurs peuvent être activés par le VEGF ou, au contraire, amplifier les effets du VEGF.

3ème partie : L'épileptogenèse : une conséquence de la dégradation de la BHE.

Ce n'est que très récemment que l'hypothèse d'un rôle de la rupture de BHE dans l'épileptogénèse a été proposée (Oby, E., *et al. - 2006,* Pitkanen, A., *et al. - 2009*). Plusieurs études révèlent qu'une rupture de la BHE, qu'elle soit accidentelle ou thérapeutique, est suffisante pour induire une crise. En effet on rapporte que des patients qui subissent un traitement d'IFN-α développent au bout de quelques jours des crises induites par la rupture de la BHE (Pavlovsky, L., *et al. - 2005*). De plus, l'ouverture transitoire de la BHE par pression osmotique pour administrer une chimiothérapie à un lymphome cérébral, provoque des crises immédiates (Marchi, N., *et al. - 2007*). De même une perméabilité importante de la BHE a été rapportée dans 79% des traumatisés crâniens développant par la suite une épilepsie (Tomkins, O., *et al. - 2008*). Tous ces cas renforcent l'hypothèse d'une corrélation entre la rupture de la BHE et une activité épileptique.
Nos travaux vont dans le même sens que ces différentes études. En effet, dans le modèle kindling, où les rats ne développent aucune crise spontanée, nous avons constaté une rupture de la BHE transitoire, suivie d'un renforcement de la BHE qui la rend plus résistante aux crises suggérant un type de préconditionnement.et de tolérance vasculaire.

Au vu de ces études, il est maintenant admis qu'une rupture de la BHE participe à l'épileptogenèse. Cependant Ces résultats soulèvent la question suivante : comment la rupture de la BHE peut-être épileptogène ?

Accumulation de protéines du sérum

Nous avons observé une accumulation d'IgGs dans le parenchyme au niveau du foyer épileptique chez l'homme et le modèle animal. Ces IgGs présentes dans le parenchyme, de façon originale, sont aussi décelées dans de nombreux neurones (interneurones et cellules pyramidales) dans les foyers chroniques humains. Chez l'animal nous avons retrouvé ce phénomène quelques heures après un SE et dans la phase chronique.

Dans la même période d'autres auteurs ont constaté une diffusion d'albumine dans le parenchyme et l'ont retrouvée dans le cytoplasme de neurones et d'astrocytes dans les foyers d'ELT, chez l'homme et l'animal (Van Vliet, E. A., *et al. - 2007*). Des études expérimentales

montrent qu'une application d'albumine au niveau néocortex induit des crises (Seiffert, E., *et al. - 2004*). Plus tard Ivens et al ont démontré que la recapture d'albumine par les astrocytes s'effectue via le récepteur du TGF-β, qui modifie à la baisse la transcription des canaux potassique Kir, réduisant ainsi le pouvoir tampon potassique des astrocytes et génère une condition épileptogène (Ivens, S., *et al. - 2007*).

Au niveau des IgGs une extravasation dans le parenchyme et une accumulation dans le cytoplasme des neurones a déjà été décrite dans le cas d'une rupture aigue de la BHE dans des maladies auto-immunes ou dégénératives (Fabian, R. H., *et al. - 1987,* Loberg, E. M., *et al. - 1993,* Orr, C. F., *et al. - 2005*). Comme l'albumine, ces IgGs pourraient être toxiques pour les neurones ou créer une auto-immunité. Dans la sclérose latérale amyotrophique, les IgGs ciblent préférentiellement les structures subcellulaires des motoneurones (Engelhardt, J. I., *et al. - 2005*). De plus, même si un mécanisme auto-immun n'a pas été clairement montré au niveau des épilepsies, il reste encore très discuté (Mcnamara, J. O. - *2002,* Roubertie, A., *et al. - 2005,* Watson, R., *et al. - 2004*). Dans notre étude nous avons remarqué une localisation préférentielle des IgGs au niveau de l'aire CA3. Actuellement, dans notre équipe, nous travaillons sur le rôle des IgGs dans l'épileptogenèse par la double approche : toxicité (Aurore Lebrun) ou auto-immunité (Suzanna Michalak et Aurore Lebrun).

Un des effets épileptogène de la rupture de la BHE pourrait s'expliquer par l'extravasation de protéines du sérum qui auraient des effets directs sur le fonctionnement neuronal. De plus l'extravasation de ces protéines modifie l'homéostasie du tissu et augmente la pression oncotique pouvant expliquer l'apparition d'œdème et l'hypoperfusion intercritique.

Extravasation de leucocytes et inflammation

Une autre conséquence de la perméabilité de la BHE est l'extravasation de leucocytes ou d'autres cellules inflammatoires dans le parenchyme (Silverman, A. J., *et al. - 2000*).

Les lymphocytes T reconnaissent la microglie par la présence du CD40 (protéine de reconnaissance de l'antigène) induisant alors leur activation. La microglie activée sécrète de nombreuses cytokines : IL-6, IL-1β, TNF-α qui activent à leur tour les astrocytes et amplifient la rupture de la BHE. En plus des lymphocytes, on note aussi une extravasation de macrophages qui, de la même façon, sécrètent un grand nombre de cytokines (Oby, E., *et al. - 2006*). Il est maintenant connu que l'extravasation de leucocytes est possible par une adhésion aux cellules endothéliales via ICAM-1, VCAM-1 et la P-selectine. Les travaux de Fabene montrent qu'après

un SE les protéines d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 ainsi que P-selectine ont une expression augmentée et que l'inhibition de l'adhésion entre leucocytes et cellules endothéliales diminue les crises (Fabene, P. F.*, et al. - 2008*).

Outre les cellules immunitaires, la présence de protéines du complément tel que C3 est rapportée dans les foyers épileptiques provoquant des « trous » dans les neurones donc toxique (Jamali, S.*, et al. - 2006*).

L'angiogenèse, provoque la rupture de la BHE, qui laisse passer des protéines et cellules sanguines. Celles-ci contribuent, avec la glie, à des réactions immunes et inflammatoires redondantes, qui aggravent à la fois l'hyperexcitabilité et la mort cellulaire dans les foyers. Ces interactions créent un véritable cercle vicieux entre « angiogenèse, perméabilité de BHE et épileptogénèse. ».

4ème partie : Protection de la BHE : De nouvelles cibles thérapeutiques ?

Existe-t-il des phénomènes de protection ?

Chez le jeune rat, l'induction d'un SE par injection de pilocarpine ne conduit pas à l'apparition de crises spontanées malgré l'absence de BHE fonctionnelle. Cette observation conduit à l'hypothèse de possible phénomènes de protection, présents chez le jeune animal jusqu'à la maturité complète du réseau vasculaire (PN20). Ces phénomènes ne sont pas connus mais nous pouvons émettre l'hypothèse d'un rôle du récepteur de type Fc qui pourrait piéger les IgGs libres voire les rediriger vers le sang comme c'est le cas des récepteurs Fc neo-nataux (Roopenian, D. C., *et al. - 2007,* Schlachetzki, F., *et al. - 2002*).

Dans le modèle kindling, nous avons observé qu'une petite crise induit une rupture de la BHE mais protège cette dernière des crises plus importantes. Ces résultats laissent penser à un phénomène de pré-conditionnement où une protection de la BHE a déjà été relatée dans plusieurs études et notamment dans l'ischémie (tolérance vasculaire). En effet, la délocalisation de ZO-1 et de la F-actine ainsi que l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 et VCAM-1 sont prévenues par un pré-conditionnement de ce type (An, P., *et al. - 2009*). De plus on rapporte aussi une diminution de l'expression et de l'activité de MMP9 (Dong, H., *et al. - 2009,* Zhang, F. Y., *et al. - 2006*).

Ces résultats confirment bien un rôle important de la rupture de la BHE dans le développement de crises spontanées et suggèrent que protéger la barrière pourrait prévenir ou réduire la fréquence ou la sévérité des crises.

Peut-on protéger la barrière en agissant sur la balance de facteurs angiogéniques ?

Le couple VEGF/VEGFR-2 est-il indispensable au foyer ?

Nous avons vu dans cette étude un rôle délétère de VEGF sur le foyer épileptique par l'induction de la perméabilité de la BHE, reconnue maintenant pour être épileptogène. De plus le système VEGF/VEGFR-2 active la neurogenèse, la migration et l'arborisation axonale (Carmeliet, P. - *2005,* Galvan, V.*, et al. - 2006*). Bien que ces effets soient considérés comme bénéfiques dans un premier temps la neurogenèse excessive ainsi que le bourgeonnement axonal aggravent la gliose et l'hyperexcitabilité dans l'épilepsie chronique (Crespel, A.*, et al. - 2005,* Mathern, G. W.*, et al. - 1995*).

Mais, comme la plupart des facteurs de croissance dont la synthèse et la sécrétion sont rapides pendant ou après les crises, VEGF est considéré comme un agent protecteur.
Le VEGF a un rôle important dans l'induction des voies de survie. Les travaux de Nicoletti démontrent un rôle crucial de VEGF dans la protection des neurones pyramidaux suite à un SE (Nicoletti, J. N.*, et al. - 2008*).
Ce facteur diminue l'activité synaptique et a ainsi été montré comme capable de réduire les décharges spontanées (Mccloskey, D. P.*, et al. - 2005*).
Un autre effet bénéfique de VEGF pourrait être l'adaptation du flux sanguin à la demande métabolique des neurones pendant la crise. En condition physiologique l'activité neuronale active un signal neuro-astrocyto-vasculaire entrainant une vague calcique, la libération de NO, de prostaglandines, de lactate permettant une adaptation rapide du débit sanguin (Gordon, G. R.*, et al. - 2007,* Zonta, M.*, et al. - 2003*). De façon intéressante, l'activation de VEGF/VEGFR-2 induit par l'intermédiaire d'Akt l'activation de la eNOS, enzyme produisant le NO entrainant alors une vasodilatation (Ahmad, A.*, et al. - 2006*). Notre équipe a déjà montré une surexpression de la eNOS au niveau des micro-vaisseaux chez les rats épileptiques, et son inhibition aggrave dramatiquement les dommages neuronaux lors d'un SE (Lerner-Natoli, M.*, et al. - 1994,* Rondouin, G.*, et al. - 1993*).

Il est donc difficile d'inhiber le couple VEGF/VEGFR-2 pour protéger la BHE car ce système est neuroprotecteur par l'activation de voie de survie et l'adapatation du flux sanguin. De plus les traitements anti-

VEGF dans les cancers révèlent des effets secondaires importants comme l'hypertension ou encore des thromboses par la reconnaissance du VEGF plaquettaire.

L'équilibre Ang1/Ang2 est-il une bonne cible ?

Nous avons remarqué dans notre travail que le ratio Ang1/Ang2 était dérégulé après des crises et de façon plus importante lors de la présence de lésions. Nous avons aussi montré que la BHE pouvait être réparé par l'application d'Ang1 après les crises.

Les protéines Ang1 et Ang2 lie le même récepteur Tie2 présent à la surface des cellules endothéliales mais possèdent des effets différents (Fiedler, U., *et al. - 2006*).
A l'inverse d'Ang2, Ang1 prévient la perméabilité de la BHE et l'inflammation en agissant à plusieurs niveaux. Dans l'ischémie on retrouve un effet bénéfique d'Ang1 par une diminution de la perméabilité de la BHE, diminuant de ce fait les lésions de la zone ischémique (Zhang, Z., *et al. - 2002*). Bien que les voies d'Ang1 soient encore peu connues, certaines sont aujourd'hui explorées. Il est montré qu'Ang1 est capable d'inhiber l'activité de src empêchant alors la phosphorylation de la VE-cadhérine (Gavard, J., *et al. - 2008*). De plus une étude récente expliquerait une diminution de la perméabilité par une augmentation de la protéine ZO-2 au niveau des jonctions serrées (Lee, S. W., *et al. - 2009*).
Dans les tumeurs ou les AVC, l'Ang2 est maintenant reconnue comme capable de potentialiser les effets du VEGF et, notamment, augmente l'activation de MMP9 et la diminution de l'expression de ZO-1 induite par VEGF (Hansen, T. M., *et al. - 2008,* Zhu, Y., *et al. - 2005*). Récemment des études en cancérologie ciblant l'Ang2 comme nouvelle cible thérapeutique ont été entreprises, et il a été démontré que la neutralisation d'Ang2 réduit les gliomes chez les souris (Villeneuve, J., *et al. - 2008*).

Nous pensons donc que des molécules « pro-Ang1 » pourraient générer une nouvelle voie thérapeutique intéressante pour les épilepsies réfractaires. En effet ces molécules pourraient être capables de restaurer ou consolider la BHE sans affecter la survie des neurones ou le débit sanguin contrairement à la neutralisation du VEGF.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Jusqu'à présent, aucune particularité morphologique commune à toutes les formes d'ELT pharmaco-résistantes n'avait été décrite. Or, la vascularisation pathologique observée dans l'hippocampe et d'autres structures du réseau épileptogène est un substrat commun à différentes formes d'ELT réfractaires aux médicaments.

Cette néo-vascularisation, induite et entretenue par les crises, fait partie d'un phénomène d'angiogenèse chronique. Nous avons montré que l'activation du couple VEGF/VEGFR-2 est nécessaire est suffisante à ce remodelage vasculaire.
Il est indéniable que le VEGF est protecteur pour les neurones pendant les crises, cependant ses conséquences sur la barrière hémato-encéphalique sont délétères pour le foyer épileptique, en termes d'excitabilité, d'inflammation, d'hémodynamique ou de pharmacorésistance.

Le dysfonctionnement vasculaire n'est sûrement pas l'unique facteur causal des épilepsies, mais il est évident qu'il existe un lien entre les crises et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Ce lien, constaté chez l'homme et démontré chez l'animal pendant ces dernières années, a été à mis l'honneur en janvier 2009 par le neuro-immunologiste R.M Ransohoff qui, dans un « News and Views » de Nature, souligne le rôle crucial de la perméabilité de la barrière dans l'initiation, la progression et la répétition des crises. Cependant, malgré l'évidence de ces dysfonctionnements vasculaires, l'angiogenèse n'a jamais été suspectée dans les épilepsies pharmacorésistantes alors qu'elle l'est dans l'ischémie et les maladies neurodégénératives.

Les travaux relatés dans cette thèse ouvrent plusieurs axes de recherche pour une meilleure compréhension des mécanismes et aussi des conséquences de l'angiogenèse pathologique dans les foyers épileptiques.
Tout d'abord, il est important de savoir dans quelles conditions la barrière rompue se répare spontanément. En comparant les facteurs régulés dans des modèles d'épilepsie où la perméabilité est chronique ou transitoire, nous espérons identifier des molécules qui contrôlent la dégradation ou la reconstruction de la barrière.
Un deuxième axe de recherches est la validation *in vivo* de nouvelles cibles thérapeutiques. Nos derniers travaux sur le système Angiopoiétines/Tie2 nous incitent à nous focaliser sur des stratégies qui modifient l'équilibre Ang1/Ang2 en faveur d'Ang1. Des collaborations nous apporteront des outils moléculaires pour intervenir sur la transcription de ces facteurs ainsi que des molécules développées pour la cancérologie, qui ciblent les angiopoiétines.

Le dernier axe concerne l'impact de la perméabilité de la barrière sur le foyer épileptique, particulièrement les effets de l'extravasation de protéines, de leucocytes ou d'ions, sur le fonctionnement des neurones ou des cellules gliales. Notre équipe étudie particulièrement l'accumulation d'IgGs sériques dans les neurones. Une autre conséquence probable de la rupture de barrière est la surexpression des transporteurs de la pharmacorésistance, et nous rechercherons un lien de causalité entre ces deux phénomènes.

La compréhension du « cross-talk » entre neurones, glie, cellules endothéliales et hématopoïétiques au cœur de l'unité neuro-vasculaire devrait nous suggérer de nouvelles cibles pour protéger la barrière et, peut-être, faciliter le passage des médicaments.
Cette approche de l'angiogenèse dans l'épilepsie est multidisciplinaire et translationnelle. Elle a commencé par l'observation de pièces d'exérèse, puis par des études mécanistiques, grâce à la modélisation *in vivo* et *in vitro*. Actuellement, elle bénéficie des avancées pharmacologiques sur les thérapies anti-angiogéniques dans les domaines de la cancérologie et l'ophtalmologie.
Nous espérons que ces travaux contribueront rapidement au développement de stratégies originales pour traiter les épilepsies partielles réfractaires.

ANNEXES

ARTICLE 1

Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy

Rigau V*, **Morin M***, **Rousset MC**, **de Bock F**, **Lebrun A**, **Coubes P**, **Picot MC**, **Baldy-Moulinier M**, **Bockaert J**, **Crespel A**, **Lerner-Natoli M**.

Brain. 2007 Jul;130(Pt 7):1942-56

* 1er auteur

Brain Advance Access published May 28, 2007

doi:10.1093/brain/awm118

Angiogenesis is associated with blood–brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy

Valérie Rigau,[1,2,3,*] Mélanie Morin,[1,2,*] Marie-Claude Rousset,[1,2] Frédéric de Bock,[1,2] Aurore Lebrun,[1,2] Philippe Coubes,[1,2,4] Marie-Christine Picot,[4] Michel Baldy-Moulinier,[4] Joël Bockaert,[1,2] Arielle Crespel[1,2,4] and Mireille Lerner-Natoli[1,2]

[1]Centre National de la Recherche Scientifique UMR5203, Université Montpellier 1, Université Montpellier 2, F34094 Montpellier, [2]Institut de la Santé et de la Recherche Medicale U661, F34094 Montpellier, [3]CHU, Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, F34295 Montpellier and [4]CHU, Unité d'Epileptologie, F34295 Montpellier

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Mireille Lerner-Natoli PhD, Institut de Génomique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 5, France
E-mail: mireille.lerner-natoli@igf.cnrs.fr

Previous studies from our group, focusing on neuro-glial remodelling in human temporal lobe epilepsy (TLE), have shown the presence of immature vascular cells in various areas of the hippocampus. Here, we investigated angiogenic processes in hippocampi surgically removed from adult patients suffering from chronic intractable TLE, with various aetiologies. We compared hippocampi from TLE patients to hippocampi obtained after surgery or autopsy from non-epileptic patients (NE). We quantified the vascular density, checked for the expression of angiogenic factors and their receptors and looked for any blood–brain barrier (BBB) leakage. We used a relevant model of rat limbic epilepsy, induced by lithium-pilocarpine treatment, to understand the sequence of events. In humans, the vessel density was significantly higher in TLE than in NE patients. This was neither dependent on the aetiology nor on the degree of neuronal loss, but was positively correlated with seizure frequency. In the whole hippocampus, we observed many complex, tortuous microvessels. In the dentate gyrus, when the granular layer was dispersed, long microvessels appeared radially orientated. Vascular endothelial factor (VEGF) and tyrosine kinase receptors were detected in different types of cells. An impairment of the BBB was demonstrated by the loss of tight junctions and by Immunoglobulines G (IgG) leakage and accumulation in neurons. In the rat model of TLE, VEGF over-expression and BBB impairment occurred early after status epilepticus, followed by a progressive increase in vascularization. In humans and rodents, angiogenic processes and BBB disruption were still obvious in the chronic focus, probably activated by recurrent seizures. We suggest that the persistent leakage of serum IgG in the interstitial space and their uptake by neurons may participate in hypoperfusion and in neuronal dysfunction occurring in TLE.

Keywords: temporal lobe epilepsy; angiogenesis; vascular endothelial growth factor; blood-brain barrier disruption; IgG leakage

Abbreviations: AVM = arterio-venous malformation; CRYPTO = cryptogenetic; DG = dentate gyrus; DGL = dentate granular layer; DNET = dysembryoplastic neuroepithelial tumour; DYSP = focal dysplasia; Ext-TLE = external temporal lobe epilepsy; FH = fissura hippocampi; GG = ganglioglioma; HA = hippocampal atrophy; HS = hippocampal sclerosis; ISCH = ischemia; SE = status epilepticus; SGL = subgranular layer; SVZ = sub-ventricular zone; TLE = temporal lobe epilepsy; VEGF = vascular endothelial growth factor; ZO-1 = zonula occludens-1.

Received December 29, 2006. Revised April 12, 2007. Accepted April 30, 2007

Introduction

The most common form of partial epilepsy, temporal lobe epilepsy (TLE) is often refractory to antiepileptic drugs, but can be treated by surgical resection of the focus (Engel, 2001). Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE), which represents more than 60% of TLE, is associated with hippocampal sclerosis (HS) characterized by severe neuronal loss and intense gliosis. In a previous study on tissue remodelling in MTLE, we described abundant neural progenitors in three areas, the sub-granular layer (SGL),

© The Author (2007). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

the subventricular zone (SVZ) and the fissura hippocampi (FH) (Crespel *et al.*, 2005). Surprisingly, we observed numerous vascular progenitor-like cells in the same areas. Moreover, in the dispersed granular layer many long microvessels, originating from the SGL, paralleled the radial astrocytic scaffolding (Crespel *et al.*, 2002). These observations suggested that a vascular remodelling occurred in MTLE. At the beginning of 20th century, vascular dysfunction was proposed to be a causal factor for MTLE or for HS (Bratz, 1899; Spielmeyer, 1927), but this hypothesis was later ruled out, due to the increased local blood flow during seizures (Gibbs, 1934). Recently, functional impairments of the vasculature and the blood–brain barrier (BBB) were reported in MTLE, such as a deficit in the control of homoeostasis by aquaporin (Eid *et al.*, 2005) or leakage of serum albumin (Van Vliet *et al.*, 2007). The latter was shown to be epileptogenic (Seiffert *et al.*, 2004; Ivens *et al.*, 2007). Nevertheless, all studies on human epileptic tissue concerned exclusively MTLE. The vascularization was not examined in TLE patients with aetiologies other than HS, even though these forms do not clearly differ from MTLE in terms of semiology and sensitivity to anti-epileptic drugs. They all present similar variations of cerebral blood flow and metabolism (Duncan, 1997; Oommen *et al.*, 2004), suggesting that haemodynamic changes are related to the epileptic activity *per se* and not to the neuropathological substrate.

The present study in adult patients suffering from intractable TLE with various aetiologies was designed to investigate: (i) vascular remodelling, (ii) the expression of angiogenic factors and tyrosine kinase receptors, (iii) a possible impairment of the BBB. In parallel, we looked for similar modifications during the development of epilepsy in the rat model of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus (SE) which generates a chronic limbic epilepsy (Turski *et al.*, 1989).

Subjects, materials and methods

Subjects and clinical data

This study was in accordance with French Ethical Committee and received the approval of the Comité National Informatique et Libertés. All patients (or their families) were informed of additional studies performed on surgical tissue and provided a written consent. Tissue was obtained and used in a manner compliant with the Declaration of Helsinki.

All patients suffered from intractable partial complex seizures and the epileptic focus was localized on the temporal lobe, as revealed by neurological examination, long-term EEG-video-monitoring and morphological MRI to detect HS, defined by T2 hyper signal and decrease of hippocampal volume. They had a right or left classical TLE, except for one patient who showed an external temporal lobe focus. All patients underwent blood flow studies with 99mTc-HMPAO-single photon emission computed tomography (SPECT), during periictal and interictal periods. All clinical data are detailed in Table 1. Surgery consisted of anterior temporal lobectomy with amygdalo-hippocampectomy made by the same neurosurgeon for all epileptic patients. Several samples of each hippocampus were either rapidly frozen in liquid nitrogen or fixed by immersion in 10% buffered formalin and processed into liquid paraffin for histological evaluation and immunohistochemistry. The temporal poles were directly frozen in liquid nitrogen.

Two hippocampal control specimens were obtained during tumour surgery of non-epileptic patients and were processed in a similar way to the surgical specimens mentioned earlier. These patients had no history of epileptic seizures but suffered from either an anaplastic oligoastrocytoma (WHO grade III, $n = 1$) or pilocytic astrocytoma (WHO grade I, $n = 1$) adjacent to the hippocampal formation. Histological examination excluded tumour cell invasion or other neuropathological alterations within the hippocampal formation. Samples of hippocampi were rapidly frozen or fixed by immersion in 10% formalin.

In addition, three specimens from autopsied adult patients without neurological disorders were used as controls. The post-mortem intervals ranged from 24 to 48 h. The tissues were immersion-fixed for at least 1 month in 10% formalin and samples were embedded in paraffin. None of these patients had clinical evidence of neurological disease and the brains were normal as confirmed by a thorough neuropathological examination. For the Western blot study, we selected a high-grade brain tumour (glioblastoma) as a positive control for angiogenesis.

Rat model of limbic epilepsy

All animal procedures were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and approved by the French Ministry of Agriculture (authorization no. 34178, M.L-N).

Surgery: 60 male Sprague–Dawley rats (Janvier, Le Genest-St-Isle, France), weighing 200–250 g at surgery were anaesthetized intraperitoneally (i.p.) with 3 ml.kg^{-1} of Equithesin and prepared for surgery, using a David Kopf stereotaxic apparatus. A deep bipolar electrode (made of 2 strands of 100 μm nickel chrome insulated wires twisted together) was implanted in the right hippocampus with the following coordinates: anterior to lamda: 4, lateral to lambda: 2.5, inferior to lambda: 2.5). Two extradural screws were inserted bilaterally in the parietal bone and one in the frontal bone (ground electrode). Deep electrodes and screws were linked to a microconnector fixed to the skull with acrylic cement.

One week post-surgery, rats were injected with lithium (3 meq.kg^{-1} i.p., Sigma, Saint-Louis, MO). Approximately 18 h later, methylscopolamine bromide (1 mg.kg^{-1} i.p., Sigma, Saint-Louis, MO) was administered to limit the peripheral effects of the convulsant. Thirty minutes later, status epilepticus (SE) was induced by injecting pilocarpine hydrochloride (30 mg.kg^{-1}, i.p., Sigma, Saint-Louis, MO) in 42 rats. Animals were put into individual boxes and their microconnectors were connected to an EEG preamplifier box (Reega mini8, Alvar, Montreuil, France). The electrical activity, recorded by deep and extradural electrodes, was filtered by a computer equipped with Dasylab software (Moenchengladbach, Germany).

For each animal, limbic seizures were recorded and observed 15–20 min after pilocarpine administration. They progressed rapidly to SE, characterized by continuous discharges on the EEG and partial as well-generalized seizures. Two hours after SE onset, we reduced the severity of convulsions with 2 mg.kg^{-1} diazepam i.p. (Roche, Neuilly, France), but limbic discharges

Table 1 Clinical data

Epileptic patients	Gender/age (y)	Side/type of epilepsy	Age at epilepsy onset (y or m)	Age at FS	Delay FPS-S (y)	Seizure frequency (*n*/month)	Aetiology	Perfusion ictal/interictal	Post-surgical outcome
P1	F/23	L TLE	7 y.	18 m.	16	5	HS	+/−	1A
P2	F/19	LTLE	7 y.	9 m.	12	5	HS	+/−	1A
P3	F/33	RTLE	28 y.	NO	5	5	HA	+/−	2A
P4	F/34	RTLE	23 y.	NO	11	3	HS	+/−	1A
P5	M/19	RTLE	3 y.	18 m.	16	5	HS	+/−	1A
P6	F/51	RTLE	13 y.	6 y.	38	5	HS	+/−	3A
P7	F/22	LTLE	4 y.	9 m.	18	9	HS	+/−	2A
P8	M/14	RTLE	12 y.	NO	2	3	DNET	+/−	1A
P9	M/26	LTLE	12 y.	NO	14	3	CRYPTO	+/−	1A
P10	F/47	RTLE	13 y.	NO	34	5	HA	+/−	2D
P11	M/33	L EXT.TLE	7 y.	NO	26	3	DNET	+/−	2B
P12	F/53	RTLE	41 y.	NO	12	10	HS	+/−	1A
P13	F/26	LTLE	18 y.	NO	8	1	DNET	+/−	1A
P14	F/22	LTLE	14 y.	NO	8	20	CRYPTO	+/−	1A
P15	M/35	LTLE	3 y.	12 m.	32	0.3	HA	+/−	1C
P16	M/30	RTLE	7 y.	NO	23	10	HS	+/−	1A
P17	F/32	RTLE	3 m.	NO	32	3	DYSP	+/−	1A
P18	M/17	RTLE	8 y.	3 y.	9	3	HS	+/−	1A
P19	F/39	RTLE	12 y.	NO	27	8	GG	+/−	1A
P20	M/47	RTLE	10 y.	NO	37	2	CRYPTO	+/−	1A
P21	M/28	LTLE	11 v	NO	17	5	HS	+/−	1A
P22	M/47	LTLE	13 m.	13 m.	46	3	HS	+/−	1A
P23	M/23	RTLE	11 y.	10 m.	12	4	HS	+/−	1A
P24	F/59	LTLE	38 y.	NO	21	3	AVM	+/−	1A
P25	M/42	RTLE	13 y.	NO	29	3	ISCH	+/−	4A
P26	M/30	RTLE	22 y.	9 m.	8	4	HS	+/−	1A
P27	F/27	RTLE	18 y.	NO	9	5	CRYPTO	+/−	1A
P28	M/47	LTLE	30 y.	NO	17	0.8	DYSP	+/−	1A
Control patients		Origin							
P29	M/20	Autopsy							
P30	M/47	Autopsy							
P31	M/31	Autopsy							
P32	F/8	Surgery							
P33	M/6	Surgery							

Note: F or M: female or male. L or R TLE: left or right temporal lobe epilepsy. Ext TLE: external temporal lobe epilepsy. Delay FPS-S: delay between first partial seizure and surgery. Aetiologies: HS: hippocampal sclerosis; HA: hippocampal atrophy; DNET: dysembryoplastic neuroepithelial tumour; DYSP: focal dysplasia; GG: ganglioglioma, AVM: arterio-venous malformation, ISCH: ischaemia, CRYPTO: cryptogenetic. Engel's classification: Ia: Fully seizure free since surgery. Id: Free disabling seizures but generalized convulsion antiepileptic drug withdrawal. 2a: Initially free of disabling seizures but rare seizures now. 2b: Rare disabling seizures since surgery. 3: Worthwhile improvement. 4a: No worthwhile improvement, some seizure reduction.

persisted on the EEG for several hours and rats exhibited partial seizures, similarly to what was reported by Andre *et al.* (2000). Eighteen control rats received the same treatment with lithium and methylscopolamine, but we used saline instead of pilocarpine. In previous experiments we and others (Andre *et al.*, 2000) compared EEG, behaviour and histology of naive and lithium-treated animals and we found no difference.

Rats were sacrificed at various time-points after the onset of SE, after an i.p. injection of 5 mg.kg^{-1} diazepam (Roche, Neuilly, France). Except for rats sacrificed in the acute period, others were recorded twice a week and we checked for interictal spikes or spontaneous seizures. Seizure recording on EEG was the only criterion to distinguish silent and chronic periods. Eleven rats died in the first week following SE. The number of animals used in this study was: for acute period, between 1 and 12 h after SE ($n = 13$), for silent period, from 4 to 14 d after SE ($n = 11$); for chronic period, between 21 and 28 d ($n = 7$). Sham-injected rats were sacrificed at similar time-points: controls for acute period: 1–3 h ($n = 4$); controls for silent period: 7–14 d ($n = 7$); controls for chronic period: 21–28 d ($n = 7$).

Histology, histochemistry and immunohistochemistry

Tissue processing

Human samples: formalin-fixed, paraffin-embedded 4-µm thick hippocampal sections were deparaffinized, and re-hydrated before histological evaluation and immunohistochemistry. For particular protocols without aldehyde fixation, frozen tissue was cut in a cryostat in 15 µm coronal sections.

Animal model: at various time-points after SE or sham injection, rats were sacrificed by decapitation after i.p. administration of 4 mg.kg^{-1} diazepam (Roche, Neuilly, France) to induce

relaxation. For standard morphological and immunohistochemical studies, brains were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer and cut with a vibratome (30 μm coronal sections). For other studies, hemispheres were separated after decapitation, one was directly frozen in nitrogen, then cut with a cryostat (15 μm coronal sections) and the other was dissected to collect the hippocampus which was frozen for protein extraction (see Western blot protocol).

Histological diagnosis

For all patients, haematoxylin-eosin (HE) staining, performed on four sections at different levels of anteriority, allowed to confirm the aetiologies. All hippocampi from patients with HS diagnosed by MRI corresponded to the histological definition of HS: shrinkage, almost complete loss of neurons from the CA1, CA3 and end folium subfields, with relative sparing of CA2 and dentate granule cells and astrocytosis in lesioned subfields (HS, $n = 13$). The histological diagnosis in the other patients included focal hippocampal atrophy corresponding to a loss of volume (not diagnosed by T2 on MRI) with partial neuronal loss in CA1 and CA4 subfields (HA, $n = 3$), dysembryoplastic neuroepithelial tumour (DNET, $n = 3$), ganglioglioma (GG, $n = 1$), focal dysplasia (DYS, $n = 2$), arterio-venous malformation (AVM, $n = 1$), para-hippocampal ischaemia (ISCH, $n = 1$) and cryptogenetic with normal histology (CRYPTO, $n = 4$).

For rats, Nissl or HE staining provided a way of detecting neuronal loss and granule cell dispersion.

Histochemical detection of vessels

Three techniques were used to easily stain the vasculature of human or rat hippocampi: (i) direct incubation of fixed sections in 3′,3′diaminobenzidine which reveals the endogenous peroxidase of red blood cells; (ii) direct staining of human or rat IgGs with species-specific antibodies (Table 2) conjugated either to fluorochrome or peroxidase; this technique allows to stain both microvessels and IgG accumulation in the parenchyma in case of BBB disruption; (iii) incubation with the biotin-conjugated *Bandeira simplicifolia* isolectin B4, revealed either by Texas Red-conjugated avidin or avidin–peroxidase complex (Vector, Burlingame, CA). After peroxidase detection using 3′,3′diaminobenzidine as a chromogen, sections were counter-stained with Nissl, haematoxylin or HE.

Immunohistochemistry

For human sections, after quenching of endogenous peroxidase, an antigen retrieval was performed by immersion in citrate buffer, pH = 6 and heating (40 min at 100°C). The primary antibodies and their dilutions are listed in Table 2. Biotinylated secondary antibodies were raised against rabbit, goat or mouse IgGs at 1/500. All immunoperoxidase reactions were performed using avidin–biotin method and 3′,3′diaminobenzidine as chromogen. For human tissue, this method was performed with the Venting automatic immunoassaying system (Ventana Nexes, AR). For double labelling, a second staining was performed with avidin-alcaline phosphatase and revealed with Fast Red (Ventana Nexes, AR). Sections were finally counterstained with haematoxylin.

For immunofluorescence in human and animal tissue, we used secondary antibodies raised against rabbit, goat or mouse IgGs, conjugated to Cy3 (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) Alexa488 or Alexa647 (Molecular Probes, Eugene, OR), at 1/2000 dilution.

For the detection of Zonula Occludens-1 (ZO-1) a marker of tight junctions, a specific protocol was necessary in human and rats: without aldehyde fixation, 15 μm frozen sections were fixed in cold methanol for 5 min at 4°C. Then a double fluorescence labelling with ZO-1 antibody and lectin was performed.

Microscope observation and image acquisition

Nissl or HE staining, immunohistochemistry revealed by peroxidase or fluorescence were observed with a Leitz DMRB microscope (Leica, Wetzlar, Germany) equipped for epifluorescence (with tight filter bands centred on the peaks of emission of Alexa Fluor488, Cy3/Texas Red, Alexa Fluor350) and digitized by a 1392 × 1040 resolution cooled CCD camera (Cool Snap, Princeton Instrument, Trenton, NJ) on a computer using Cool Snap program and transferred to Adobe Photoshop (version 7) for image processing.

Rat double-labelled sections were observed using a confocal microscope (Zeiss 510 Meta, Göttingen, Germany) equipped with an ×25 objective (multi-immersion, numeric opening 0.8) and an ×63 objective (oil, numeric opening 1.4). We used an argon laser (excitation 488, emission 505–530 nm) for Alexa488, a helium laser (excitation 543, emission 585–615 nm) for Texas Red and a krypton-argon laser (excitation 647 nm, emission 660–700 nm) for Alexa647. Images were collected sequentially to avoid cross-contamination between fluorochromes. Series of 15 optical sections were projected onto a single image plane and scanned at 1024 × 1024 pixel resolution.

Western blot

Human tissue: Immediately after surgery, hippocampi and temporal poles were frozen in nitrogen and stored at −80°C. Samples were dissected, mechanically dissociated and homogenized in lysis buffer containing Tris (50 mM), EGTA (1 mM), sucrose (250 mM), non-ionic detergent Igepal (0.05%, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France), ionic detergent sodium deoxycholate (0.25%, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics, Meylan, France). After 10 min incubation at room temperature, samples underwent centrifugation for 15 min at 14 000 rpm at 4°C.

Rat tissue: Hippocampi were frozen and stored at −20°C immediately after dissection. They were mechanically dissociated and homogenized in a lysis buffer containing Tris (50 mM), EGTA (1 mM), sucrose (250 mM), phosphatase inhibitors (10 mM sodium fluoride and 1 mM orthovanadate) and protease inhibitor mixture. Samples underwent centrifugation for 10 min at 2300 rpm at 4°C. The supernatant was centrifuged at 37 000 rpm at 4°C for 30 min. Then the supernatant with soluble proteins was stored and membrane proteins in pellet were re-suspended in solubilization buffer containing Tris (50 mM), EDTA (1 mM), phosphatase inhibitors (10 mM sodium fluoride and 1 mM orthovanadate) and protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Protein concentration was determined by using a BCA-Kit assay (Sigma, Saint-Louis, MO). Samples of 50 μg of protein boiled in Laemmli buffer were loaded onto a 12.5% acrylamide gel, separated electrophoretically and transferred to

Table 2 Primary antibodies and vascular markers

Primary antibodies	Source	Isotype	Clone or reference	Dilution	Supplier	IHC	WB
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Mouse monoclonal	IgG1 kappa	6F2	1/500 DAKO	DAKO Glostrup Denmark	+	
NeuN	Mouse monoclonal	IgG1	MAB377	1/500	CHEMICON Temecula CA	+	
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	* Rabbit polyclonal	IgG	Sc-507	1/200	Santa Cruz	+	
	* Mouse monoclonal	IgG	Sc-7269	1/100	Biotechnology		+
	* Goat polyclonal	IgG	Sc-1836	1/200	Santa-Cruz CA	+	+
CD31 (PECAM1)	Mouse monoclonal anti-human	IgG1 kappa	JC70A	1/20	DAKO Glostrup Denmark	+	
Vimentine	Porcine monoclonal	IgG1	V9	1/6 Ready-to-use	Immunotech Temecula CA	+	
Von Willebrand Factor	Mouse monoclonal	IgG1 kappa	F8/86	1/50	DAKO Glostrup Denmark	+	
Ki67	Mouse monoclonal	IgG1 kappa	MIB1	1/100	DAKO Glostrup Denmark	+	
Neurofilaments	Mouse monoclonal	IgG1 kappa	2F11	1/100	DAKO Glostrup Denmark	+	
Flk-1	Rabbit polyclonal	IgG	Sc-504	1/200	Santa Cruz	+	
				1/600	Biotechnology Santa-Cruz CA		+
Tie-2	Rabbit polyclonal anti-mouse	IgG	Sc-324	1/200	Santa Cruz	+	
				1/600	Biotechnology Santa-Cruz CA		+
Zonula Occludens 1 (ZO-1)	Rabbit polyclonal anti-human	IgG	61-7300	1/200	Zymed San Fransisco CA	+	
actin	Mouse monoclonal	IgG	ACTN05	1/1000	LabVision Fremont CA		+
OTHER MARKERS							
lectin	Biotinylated Isolectin B4		L-3759	1/200	SIGMA-ALDRICH St Quentin Fallavier-France	+	
Human IgG	Mouse biotinylated monoclonal	IgG	A57H	1/100	DAKO Glostrup Denmark	+	
Rat IgG	*Goat Alexa488 coupled Polyclonal	IgG	O-6382	1/2000	Molecular Probes Eugene OR	+	
	*Rabbit biotinylated polyclonal	IgG	BA-4001	1/100	Vector Labs Burlingame, CA	+	

polyvinyldifluoridine membranes (Hybond-C-extra, Amersham Biosciences, UK). Membranes were incubated 2 h in Tris buffered saline + Tween 5% (TBST) containing 5% skimmed milk, then overnight at 4°C with the following antibodies diluted in TBST + milk: VEGF, Flk-1, Tie-2 or Actin (see Table 2 for source and dilution). After washes in TBST, the secondary incubation was performed during 2 h at room temperature with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Jackson ImmunoResearch Ann Arbor, ME) 1/4000 or rabbit anti-goat antibody 1/5000 (Chemicon Temecula, CA). After three washes, chemoluminescence detection reagents (Western Lightening, Perkin Elmer and MA) enabled visualization of peroxidase reaction products. To quantify VEGF expression in the rat model, Western blots were analysed by densitometry using Photoshop and ImageJ.

Data analysis and statistics

Vascularization of human hippocampi from three groups of patients (NE $n = 5$, TLE without HS $n = 9$, TLE + HS $n = 8$) was quantified as follows: for each patient, three sections cut at different levels of the septo-temporal axis were immunostained with an anti-Von Willebrand factor antibody. On the three sections, images centred either on pyramidal or granular layers were acquired at ×20 magnification in each area: CA1/2, CA3/4 and DG. The density of microvessel network was quantified

according to the point-counting method (de Paz and Barrio, 1985) which takes into account the number, size and tortuosity of all vessels. A 5×5 grid (total field: $0.08\,mm^2$) was superposed to the digitized image, the number of labelled vessels crossing the grid was counted by an independent experimenter and expressed as vascular density (in arbitrary units) for a $0.08\,mm^2$ area. For each patient, the values obtained from the three areas (CA1/2, CA3/4 and DG) in the three sections were pooled to obtain a mean value for the whole hippocampus. Individual data were represented on a histogram.

The values of vascular density in the three groups of patients were compared using the non-parametric Kruskall–Wallis test with Bonferroni correction. The Spearman correlation coefficient was used to check for relationship between vascular density and other clinical parameters: age, gender, duration of epilepsy and seizure frequency.

In order to evaluate the progression of the vascular network in the rat model, we quantified vascular density in the hippocampus of pilocarpine-treated rats and their age-matched controls sacrificed during acute, silent or chronic periods. Coronal sections were collected at three levels of the septo-temporal axis and stained with 3′,3′ diaminobenzidine and haematoxylin. For each animal, four images at $\times 1.25$ magnification of the hippocampus (anterior, median, postero-dorsal, postero-ventral) were digitized. The surfaces of the hippocampus and of the surrounding lateral ventricle were measured using Photoshop and ImageJ (Fig. 6B). The ratio of surfaces: hippocampus/(hippocampus + ventricle) was used as an index of hippocampal shrinkage and ventricle dilatation of dorsal and ventral hippocampus. At each level (anterior, median, postero-dorsal, postero-ventral), images centred on CA1median, CA1lateral, CA3, CA4 and DG were acquired at $\times 5$ magnification and digitized (Fig. 6B). The point-counting was made with a 5×5 grid (total field: $1\,mm^2$) by two independent experimenters. The score was expressed in arbitrary units of vascular density for a $1\,mm^2$ area. The values of vascular density in the four areas (CA1median + lateral, CA3, CA4 and DG) were weighed using the ratio described earlier to take into account the hippocampal shrinkage.

We looked for putative differences in vascularization of the anterior and posterior parts of the hippocampus by measuring anterior and posterior densities in each animal, compared between the different groups by the paired-sample Wilcoxon rank test.

To reveal differences in vascular density between pilocarpine-treated rats and age-matched controls all individual data were pooled (for each area and for the whole hippocampus) and compared at each period, using the Kruskal–Wallis test and Bonferroni correction.

For animal studies, we quantified Western blot analysis by measuring optical density and compared control and pilocarpine-treated rats with the Kruskal–Wallis test and Bonferroni correction.

Results

Vascularization of the hippocampus in human TLE

An increase in the density of the vascular network was observed in TLE patients, whatever their aetiology: the size of large vessels remained unchanged, but the microvessels appeared longer, more tortuous and numerous than in NE subjects in all hippocampal areas, particularly in the layers containing neuronal cell bodies (Fig. 1A). Moreover, in patients with TLE+HS, the microvessels appeared radially orientated in the dispersed granular layer. The histogram in Fig. 1B shows individual values of vascular density for the whole hippocampus. The comparison of groups of patients revealed significant differences between epileptic and non-epileptic subjects (NE versus TLE and NE versus TLE+HS, $P < 0.01$). There was no difference between either groups of epileptic patients (TLE versus TLE+HS) and no correlation was found between the vascular density and the intensity of damage (ranging from cryptogenetic TLE to TLE+HS). We found that the vascular density was correlated neither to age and gender of patients, nor to duration of epilepsy.

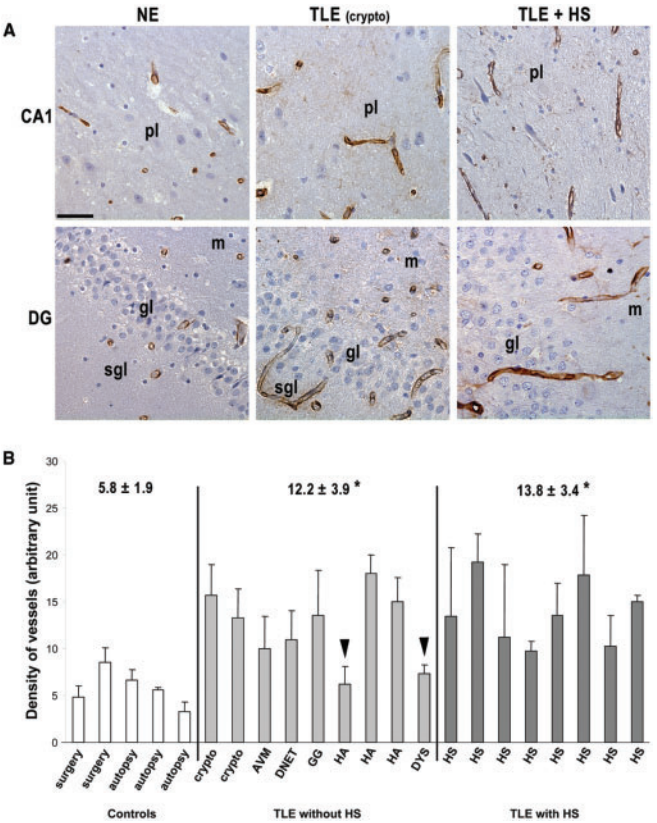


Fig. 1 Vascularization of the hippocampus in NE and TLE patients. (**A**) Immunohistochemical detection of Von Willebrand factor in CA1 area and in dentate gyrus (DG). Anti-F8 antibody, Haematoxylin counterstaining. NE: non-epileptic patient, TLE (crypto): cryptogenetic temporal lobe epilepsy; TLE+HS: temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, pl: pyramidal layer, gl: granular layer, sgl: subgranular layer, m: dentate molecular layer. Scale bar: 50 μm. (**B**) Vascular density in the hippocampus was evaluated by the point counting method and expressed in arbitrary units for five NE patients, nine TLE patients with other aetiologies than HS and eight TLE patients with HS. Crypto: cryptogenetic, AVM: arterio-venous malformation, DNET: dysembryoplastic neuroepithelial tumour, GG: ganglioglioma, HA: hippocampal atrophy, DYS: focal dysplasia. Arrowheads show two TLE patients who had a very low seizure frequency. For each group of patients, mean and SEM were compared by Kruskall–Wallis test with Bonferroni correction. $^*P < 0.01$.

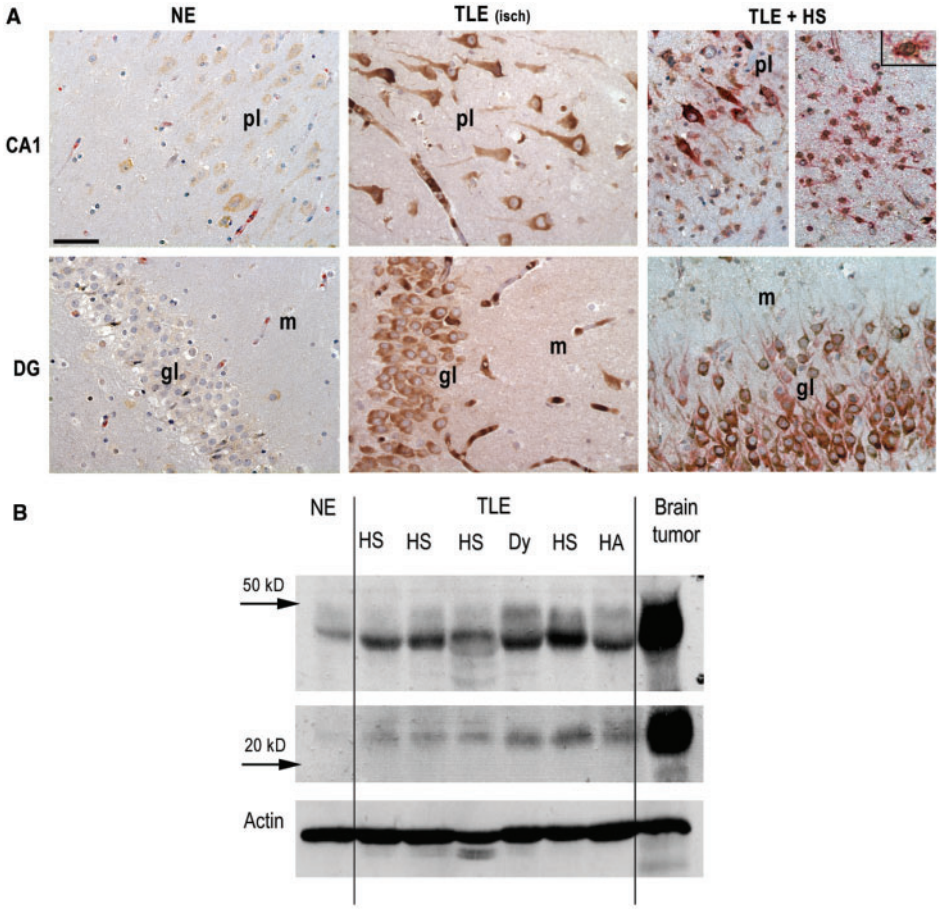


Fig. 2 VEGF expression in human TLE. (**A**) Immunostaining of VEGF (brown) and vimentin (red) in CAI and dentate gyrus from a non-epileptic patient (NE) and from two patients with TLE, either secondary to an ischaemic event (isch) or associated with hippocampal sclerosis (HS). Higher magnification: astrocyte positive for VEGF and vimentin. Haematoxylin counterstaining. pl: pyramidal layer, gl: granular layer, m: dentate molecular layer. Scale bar: 50 μm. (**B**) Detection on Western blot of the different isoforms of VEGF. NE: hippocampus surgically removed from a non-epileptic patient. TLE patients with various aetiologies; hippocampal sclerosis (HS) or hippocampal atrophy (HA) or focal dysplasia (Dy). A tumour tissue (glioblastoma) was used as a positive control for angiogenesis and actin antibody as a control of experimental variations.

Nevertheless, it was significantly correlated with the frequency of seizures (Spearman coefficient: 0.53, $P<0.05$). It is worth noting that two patients with less than one seizure per month (see arrowheads on Fig. 1B) showed a low density of vessels, while other patients with 1 to 20 seizures per month displayed similar increases in vascular density.

Expression of the vascular endothelial growth factor

We evaluated the expression of VEGF in the hippocampi of all TLE and NE patients. A basal level of VEGF expression was observed in neurons of control hippocampi, but in one NE patient (autopsy after suicide) the VEGF staining was very strong in CA1 pyramidal neurons. This demonstrates that these neurons are extremely sensitive to anoxia and that VEGF induction is rapid. Therefore, only for VEGF expression, the hippocampi obtained after ablation of para-hippocampal tumours under the same surgical conditions as for TLE patients, were used as controls.

In patients with TLE, pyramidal neurons and granule cells were strongly immunopositive for VEGF. Other cell types were also stained, but this expression seemed to depend on aetiology: in cases of TLE secondary to ischaemia or arterio-venous malformation, VEGF was highly expressed in vascular cells, whereas in all patients with HS, VEGF was present in reactive astrocytes of the CA1 area (Fig. 2A).

Western blot analysis was used to evaluate the expression of different isoforms of VEGF by their molecular weight. In human, we observed two isoforms, one at 46 kDa corresponding to the long form of VEGF165 and the other at 21 kDa corresponding to the short form of VEGF121 (Tee and Jaffe, 2001). A high grade tumour (glioblastoma) was used as a positive control for a maximal expression of VEGF isoforms. These results confirmed the slight basal level of VEGF in the hippocampus of NE patients and its

over-expression (both isoforms) in different TLE patients with either HS or other aetiologies (Fig. 2B). Patients with a low seizure frequency and a 'normal' vascularization had a moderate expression of VEGF, higher than NE patients (see the lane 'HA' on western blot).

Expression of tyrosine kinase receptors

The VEGF receptor 2 (VEGF-R2 or Flk-1) was expressed in very few vascular cells in the hippocampus of NE subjects; in TLE patients, Flk-1 immunostaining was obvious in all hippocampal areas, mainly on short, branched and sprouting collaterals of microvessels (Fig. 3A).

A similar staining pattern was observed for the angiopoietin receptor Tie-2, which is also crucial in angiogenesis and BBB integrity (Zhang and Chopp, 2002; Eklund and Olsen, 2006). Tie-2 was rarely detected in control tissues, whereas many Tie-2-positive cells were obvious in the hippocampi of all TLE patients, in vascular walls and sprouting collaterals. Moreover, a strong cytoplasmic Tie-2 staining was present in numerous single, small, round cells. They seemed to derive from highly vascularized areas (SVZ, FH) and to invade all hippocampal regions. In the vicinity of microvessels, some of them were grouped in clusters along the vascular walls (Fig. 3B). These Tie-2-positive cells were immunoreactive for CD31 (Fig. 3C) and lectin (not shown). Like for VEGF, the expression of both receptors did not differ depending on the aetiology of TLE (Fig. 3D).

Disruption of the blood–brain barrier

To evaluate the putative damage of the BBB, we looked for a leakage of serum IgGs using immunohistochemistry. In NE patients, IgGs were restricted to the inside of vessels (not shown), whereas in TLE subjects we observed an extravascular IgG staining in different areas. IgGs formed halos with a concentration gradient around vessels in the dentate granular layer and the hilus. In CA1/CA3 areas, IgG staining was widespread in the parenchyma. Surprisingly, the cytoplasm and dendrites of numerous pyramidal neurons were clearly immunoreactive for IgGs (Fig. 4A). Additionally, we checked for the expression of ZO-1, a marker of tight junctions, in only one patient with TLE; the immunostaining required a specific fixative protocol, we therefore could not use other samples. We observed an irregular and discontinuous expression of ZO-1 in microvessels identified by lectin (Fig. 4B).

Angiogenic processes in extra-hippocampal structures of the epileptogenic network

To address the question of vascular changes in extra-hippocampal structures, we looked for angiogenic factors and receptors in the temporal pole of TLE patients with different aetiologies. The levels of VEGF isoforms, of Flk-1 and of Tie-2, evaluated by Western blotting, were comparable to those measured in the hippocampus, without any correlation with the aetiology of TLE (Fig. 5A). Therefore, angiogenic factors seem to be highly expressed in extra-hippocampal structures which participate in the epileptogenic network. It is worth noting that haemodynamic variations affect the temporal pole as well as the hippocampus. These variations do not depend on damage, as illustrated by SPECT images of cerebral blood flow, in a patient with a cryptogenetic TLE (Fig. 5B).

Neuronal loss, shrinkage and neo-vascularization in the animal model of TLE

In rats, the lithium-pilocarpine injection induced a limbic, secondarily generalized status epilepticus. Neuronal loss affected many structures: hippocampus, amygdala, piriform and entorhinal cortices, thalamic nuclei and substantia nigra. Rats that experienced SE developed spontaneous seizures after 3–4 weeks (chronic period). At this time, neuronal loss was evident in pyramidal layers of CA1, CA3 and CA4, frequently associated with a severe dilatation of lateral ventricles surrounding the shrunken dorsal hippocampus. The surface ratio hippocampus/(hippocampus+ventricle) decreased gradually, mainly in dorsal hippocampus, reflecting a progressive shrinkage (around 10% at 1 week post-SE and $\geqslant$20% during the chronic period).

As shown in Fig. 6A, the vascular network increased in epileptic rats. There was no obvious difference in the density of vessels between rats sacrificed during SE and controls. During the silent period, microvessels appeared more numerous in the SVZ, FH and SGL; in the chronic period, their number, size and complexity were greatly increased in these areas and in the pyramidal and granular layers.

Quantification with the point-counting method revealed that rats showed an increase in vascular density during silent and chronic periods compared to age-matched controls ($P<0.01$ and 0.02 respectively) (Fig. 6C). Moreover, individual values were stronger in anterior than in posterior hippocampus, even after correction by the shrinkage ratio ($P<0.05$).

Angiogenic factors in the animal model of TLE

VEGF expression was studied in rat hippocampi during acute, silent and chronic periods (Fig. 7A). In control rats, neurons and astrocytes expressed a basal level of VEGF. During SE, some neurons showed a high level of VEGF likely stored in vesicle-like structures. During the silent period, both neurons and astrocytes strongly expressed VEGF in large vesicles. During the chronic period, the main source of VEGF was the high amount of hypertrophic, reactive astrocytes. Western blot analysis revealed two bands corresponding to long forms of VEGF165 (46 kDa) and VEGF121 (35 kDa) (Fig. 7B). The levels increased

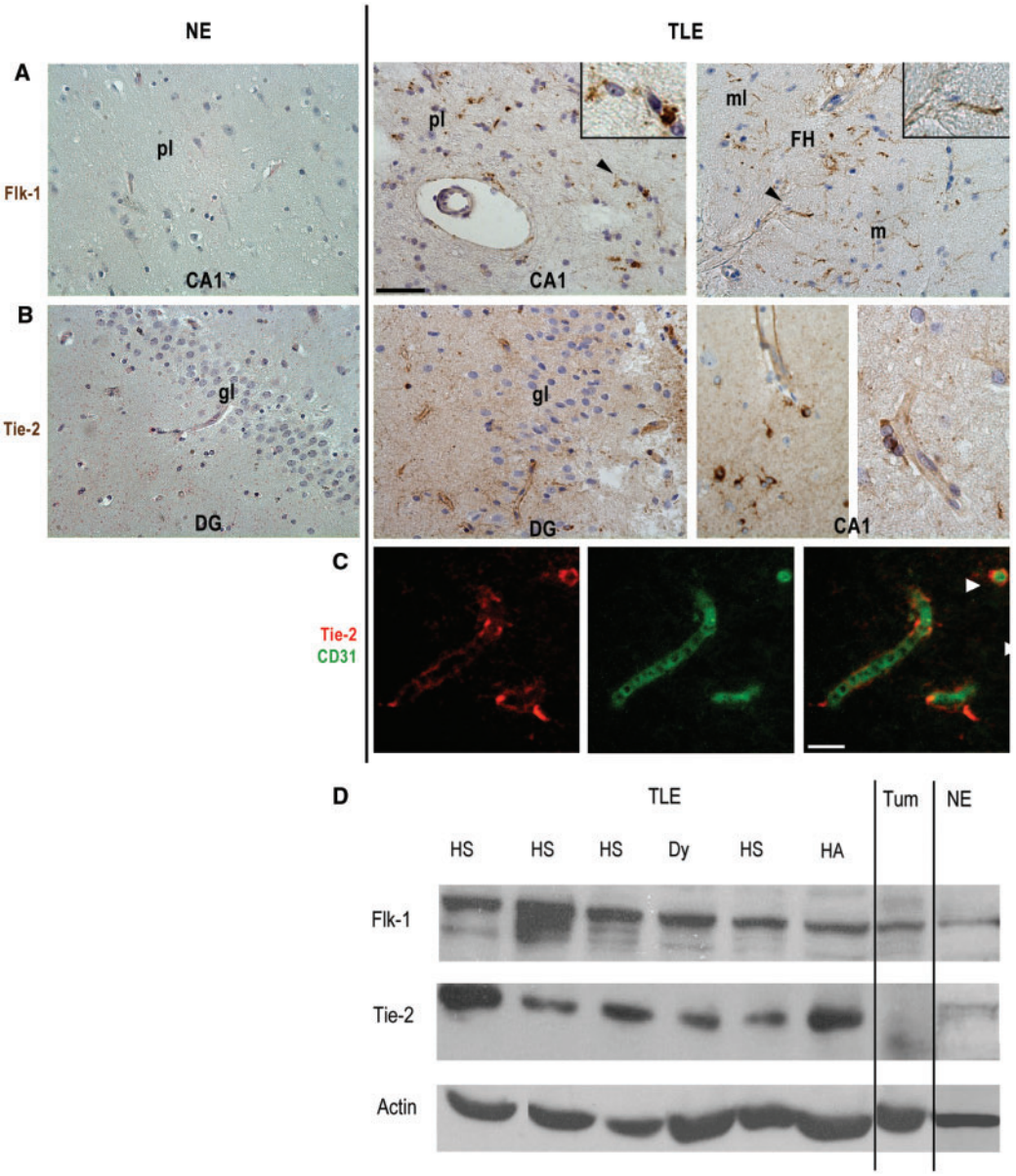


Fig. 3 Expression of receptors of angiogenic factors in Human TLE. Non-epileptic (NE, left) and epileptic patients (TLE, right). (**A**) Immuno-detection of Flk-1 (VEGF receptor-2) in thin sprouting collaterals, in CAI area or in the vicinity of the fissura hippocampi (FH) from TLE patients. Arrowheads indicate stained microvessels observed at higher magnifications. pl: pyramidal layer, ml: hippocampal molecular layer, m: dentate molecular layer. (**B**) Immunostaining of Tie-2 (angiopoietin receptor) in microvessels of the granular layer (gl) of the dentate gyrus (DG) and of the CAI area from TLE patients. Tie-2 is also expressed by small round cells, either single or arranged in clusters close to vessels. Scale bar: 50 μm for A and B (DG), 25 μm for B (CAI). Haematoxylin counterstaining. (**C**) Immunofluorescent detection of Tie-2 (left), CD3I (middle) and merge (right), suggesting that single Tie-2 positive cells are endothelial immature cells. Scale bar: 25 μm. (**D**): Western blot with antibodies against Flk-1 and Tie-2. TLE patients with various aetiologies; hippocampal sclerosis (HS) or hippocampal atrophy (HA) or focal dysplasia (Dy). NE: hippocampus surgically removed from a non-epileptic patient. A tumour tissue (glioblastoma) was used as a positive control for angiogenesis and actin antibody as a control of experimental variations.

significantly in SE rats during the acute period compared to controls ($P<0.05$), decreased to basal levels in the silent period and slightly increased again during the chronic period (Fig. 7C).

BBB disruption in the animal model of TLE

The detection of extra-vascular IgGs (Fig. 8A) revealed a rapid BBB impairment after SE and, as for human TLE, a particular cytoplasmic staining in neurons. IgGs were first found in interneurons of the stratum oriens and the hilus during the acute period, then in numerous pyramidal neurons of CA1, CA3 and CA4, intensely during the silent period and at a lower level during the chronic period. Using an immuno-peroxidase detection of rat IgGs counterstained with HE, we superposed the brightfield image of IgGs and the fluorescent image of eosin.

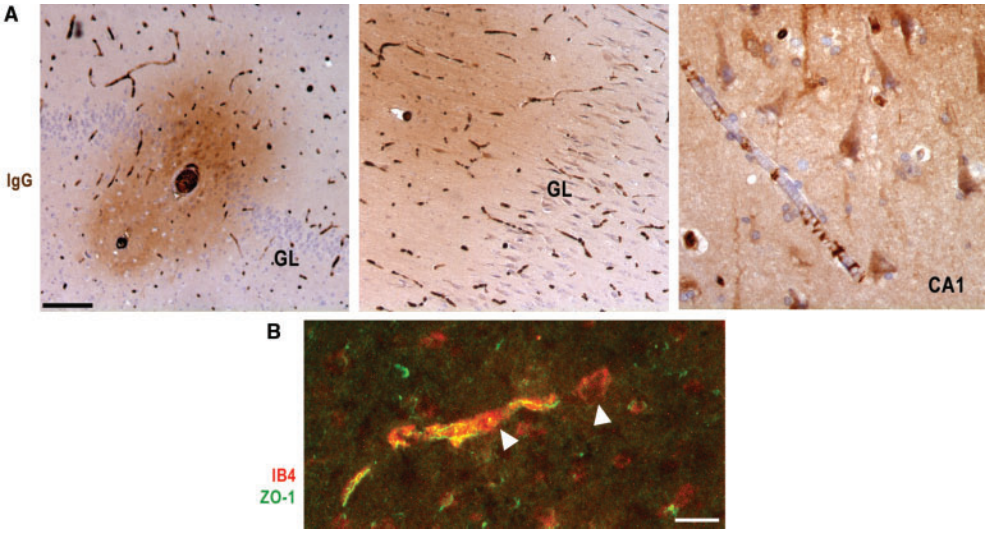


Fig. 4 Disruption of the blood–brain barrier in human TLE. (**A**) IgG leakage (anti-Human IgG antibody, Haematoxylin counterstaining). IgGs form halos around microvessels inside and under the granular layer (GL). In CA1, IgG staining is diffuse in the interstitial space and dense in the cytoplasm of pyramidal neurons. Scale bar: left and middle 200 μm, right 50 μm. (**B**) Loss of tight junctions. Immunostaining of zonula-occludens-1 (ZO-1, green) and labelling of vessels with isolectin B4 (IB4) in CA1 area. Scale bar: 15 μm.

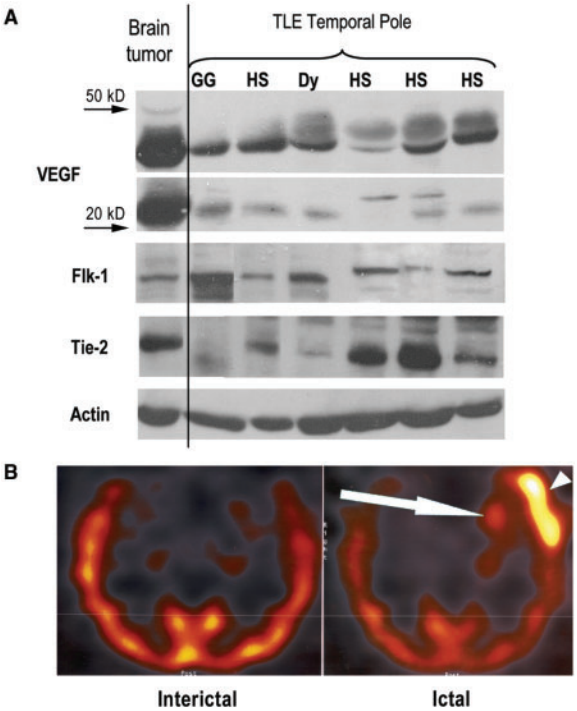


Fig. 5 Angiogenic processes and haemodynamic changes in extra-hippocampal structures of the epileptogenic network. (**A**) Expression of angiogenic factors and receptors in the temporal pole evaluated by Western blot with antibodies against VEGF (different isoforms), Flk-1 and Tie-2. Aetiologies were: hippocampal sclerosis (HS), focal dysplasia (Dy) or ganglioglioma (GG). A tumour tissue (glioblastoma) was used as a positive control and actin antibody as a control of experimental variations. (**B**) Cerebral blood flow measured by 99mTc-HMPAO-SPECT during interictal and ictal periods in a patient with cryptogenetic TLE. Arrows show the hippocampus and arrowheads the temporal pole: both are hyperperfused during seizures and hypoperfused in interictal periods.

We observed that most IgG-positive neurons were eosinophilic during silent and chronic periods. The loss of tight junctions was assessed by ZO-1 staining at all time-points. Hippocampal vessels of control rats showed a uniform staining of ZO-1 at inter-endothelial junctions, whereas 3 h after the beginning of SE and at later stages, the vascular ZO-1 staining was discontinuous (Fig. 8B).

Discussion

This study demonstrates for the first time an aberrant angiogenesis in chronic temporal lobe epilepsy, whatever the history of the disease or its morphological substrate. Using a relevant animal model of limbic epilepsy, we were able to provide evidence of some key events involved progressively in this vascular remodelling: (1) a transient up-regulation of VEGF in neurons after seizures, (2) the expression of tyrosine kinase receptors in microvessels, (3) an angiogenic sprouting, (4) the disruption of the BBB with a leakage of IgGs, (5) their uptake by neurons.

Causes of angiogenesis

Are seizures the trigger?

We postulate that angiogenesis observed in human TLE is not a consequence of excitotoxic processes or inflammatory reactions, but is induced by seizures *per se*. Our hypothesis is based on: (i) the massive up-regulation of VEGF in neurons after acute, short or long lasting seizures, described here and by others (Newton *et al.*, 2003; Croll *et al.*, 2004), (ii) the comparable increase in vascular density and the similar levels of angiogenic factors in TLE, whatever the aetiology or the extent of damage, (iii) the similar expression of VEGF and its receptors in the hippocampus,

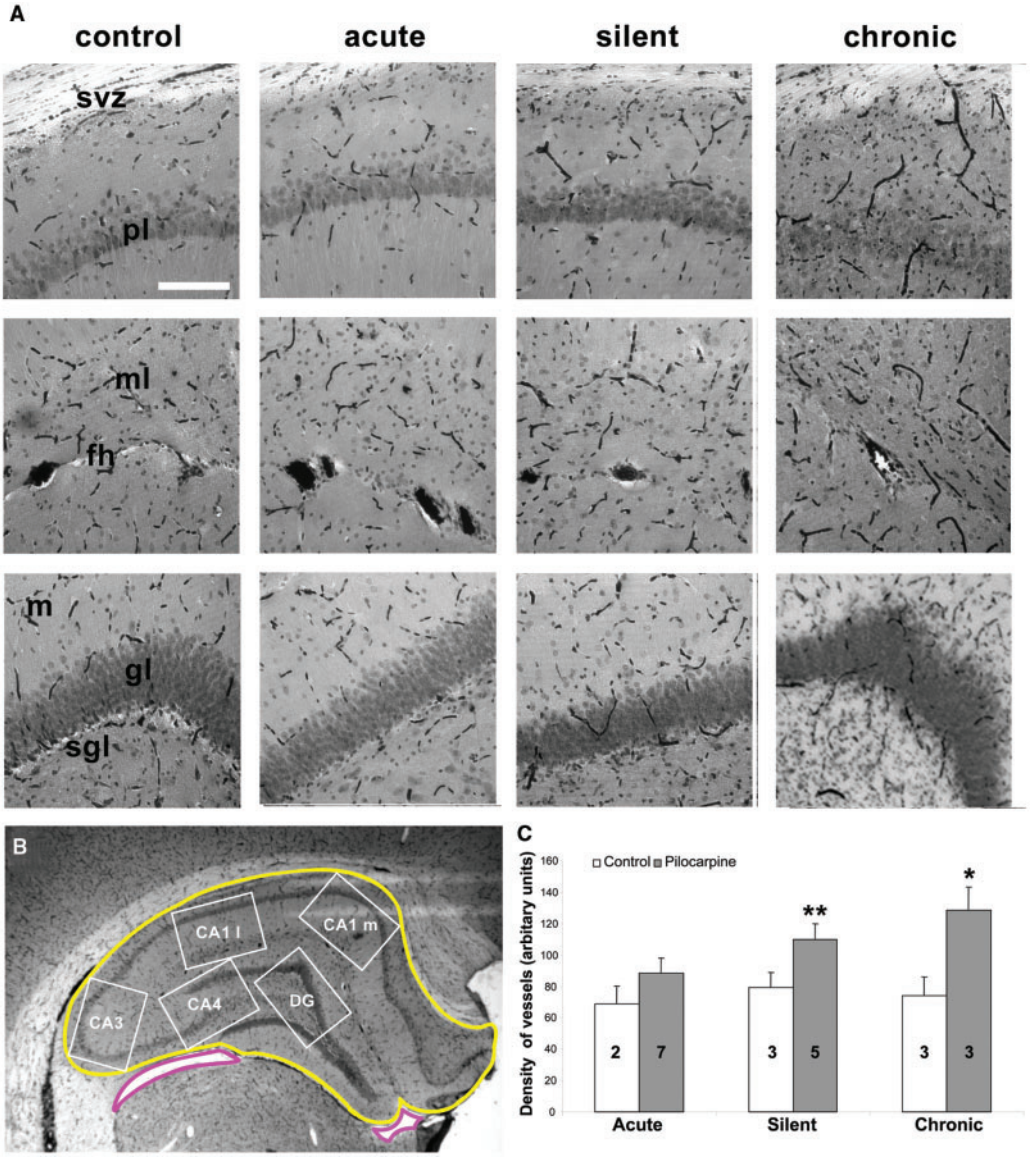


Fig. 6 Increased vascularization of the hippocampus in a rat model of limbic status epilepticus (SE) induced by lithium-pilocarpine. (**A**) Vascularization in different regions of the hippocampus in a control rat and rats sacrificed during acute, silent and chronic periods; upper images show the subventricular zone (svz) and the pyramidal layer (pl) of CA1, middle images the fissura hippocampi (fh) and the molecular layer (ml) of CA1, lower images the subgranular layer (sgl) the granular layer (gl) and the stratum moleculare (m) of the dentate gyrus. Detection of endogenous peroxidase by di-aminobenzidine, Nissl counterstaining, scale bar: 100 μm. (**B**) Schema superposed on a digitized image of the hippocampus, showing the hippocampal (yellow) and ventricular (pink) surfaces which were measured to evaluate the hippocampal shrinkage; white frames represent the position of the areas selected to quantify the density of vessels, as described in methods. (**C**) Means and SEM of vessel density in the hippocampus of rats sacrificed at different periods (acute, silent and chronic) after pilocarpine-induced SE and of age-matched controls. $^{*}P < 0.02$, $^{**}P < 0.01$, Kruskall–Wallis test, Bonferroni correction.

the primary focus and in the temporal pole cortex, a structure involved in the propagation of seizures (Chabardes *et al.*, 2005).

Once initiated, the angiogenic processes increase progressively, even in the absence of seizures as observed during the silent period, in the present study, or after single short seizures induced by electro-convulsive shock (Newton *et al.*, 2003; Hellsten *et al.*, 2005; Newton *et al.*, 2006). In the chronic period, the high expression of VEGF and tyrosine kinase receptors suggest that angiogenesis is either chronic or recurrently activated by spontaneous seizures. To support the second hypothesis, we found a positive correlation between seizure frequency and vascular density.

Up-regulation of VEGF and Flk-1

We suggest that the first step in the course of angiogenic events is the induction of VEGF by seizures. In rats, an up-regulation of VEGF in neurons and glia was described

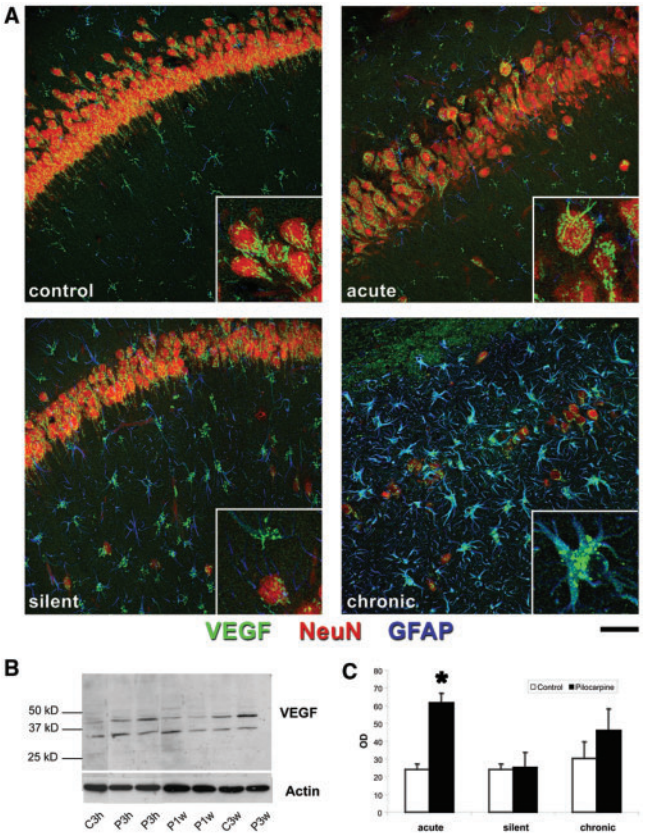


Fig. 7 VEGF expression in rats after limbic status epilepticus (SE). (**A**) Confocal images of immunostaining of VEGF (green), NeuN (red) and GFAP (blue) in the CA1 area of control and pilocarpine-treated rats sacrificed during acute, silent and chronic periods. The pyramidal layer is strongly labelled with the specific neuronal marker NeuN. Higher magnifications show neurons or astrocytes expressing VEGF in vesicle-like structures (green spots). Scale bar: 50 μm. (**B**) Western blot showing the different isoforms of VEGF at 3 h, 1 week and 3 weeks after pilocarpine-induced SE (P3h, P1w, P3w) and at 3 h or 3 weeks for control animals (C3h, C3w). The actin antibody was used as a control of experimental variations. (**C**) Quantification of Western blot analysis, expressed in optical density, comparing the VEGF expression in the hippocampus of pilocarpine-treated rats and age-matched controls at the three periods ($n = 2$ for each condition). $^{*}P < 0.05$. Kruskall–Wallis test, Bonferroni correction.

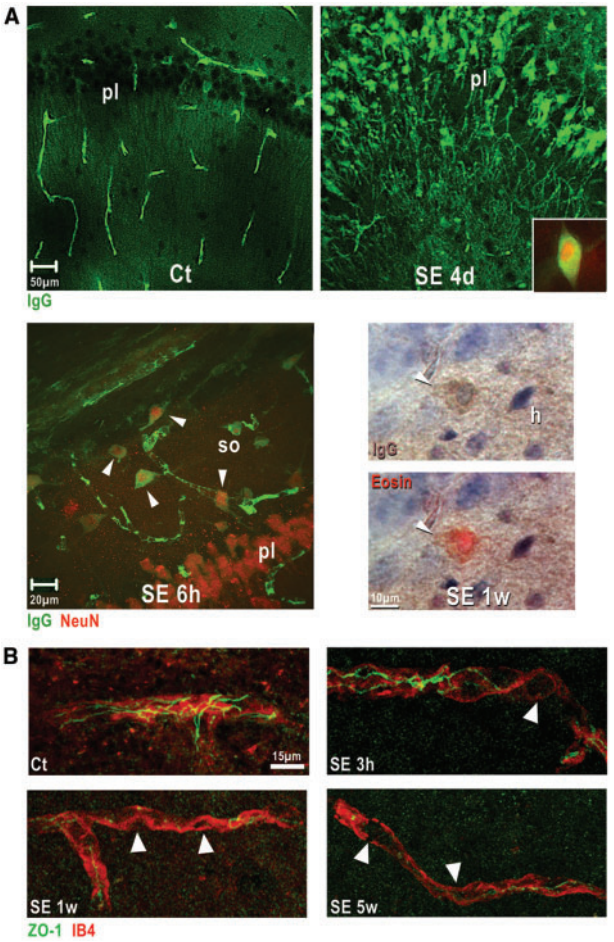


Fig. 8 Disruption of the blood–brain barrier in rats after limbic status epilepticus (SE). (**A**) IgG leakage and uptake by neurons at various time-points after SE. Ct and SE 4d: confocal images of IgG staining in vessels and in neurons in the CA3 area from a control rat and a rat sacrificed during the silent period (4 days after SE). Box: higher magnification of a CA3 pyramidal neuron double-labelled for IgG (green) and NeuN (red). SE 6 h: confocal image of the CA1 pyramidal layer (pl) and stratum oriens (so) of a rat sacrificed during the acute period (6 h of SE), stained for IgG (green) and NeuN (red); arrowheads indicate double-labelled interneurons. SE 1w: immunoperoxidase detection of IgG in the hilus of a rat sacrificed during the silent period (1 week post-SE) and superposition of the fluorescence emission of eosin; the arrowhead shows an interneuron which is IgG-positive and eosinophilic. (**B**) Confocal images of tight junctions, revealed by immuno-staining of zonula-occludens-1 (ZO-1, green) and labelling of vessels with isolectin B4 (IB4, red) in a control rat and at various time-points after SE. Arrowheads indicate the loss of tight junctions.

after SE by Croll *et al.* (2004). These authors proposed that hypoxia was the triggering factor, since the VEGF promoter contains a responsive element to the hypoxia-inducible factor (HIF) (Semenza, 2000). This is likely to be the case during a long-lasting SE. Nevertheless, VEGF can be also induced in response to intracellular signals of metabolic stress or to extracellular stimuli such as cytokines (Pages and Pouyssegur, 2005), that are known to occur in human and experimental seizures (Kann *et al.*, 2005; Vezzani and Granata, 2005).

In the chronic focus, we observed a strong VEGF expression by neurons in all cases of TLE. Glial or vascular expression of VEGF was rare and probably correlated with the aetiology: VEGF was observed in astrocytes in TLE with HS and in vascular cells in TLE associated with extra-hippocampal ischaemia or vascular malformation. In the rat model of TLE with neuronal loss and gliosis, we confirmed a progressive over-expression of VEGF by astrocytes. The levels of both isoforms of VEGF in the hippocampus or temporal pole of TLE patients compared to a high grade brain tumour suggested that the chronic focus is persistently exposed to a high concentration of VEGF. Even if

there are other factors released during seizures that participate in the neo-vascularization of the focus, the local concentration of VEGF is a pivotal actor that induces either a physiological or an aberrant angiogenesis (Ozawa *et al*., 2004).

VEGF activates tyrosine kinase receptors expressed by different types of cells which promote both angiogenesis and neuroprotection (Storkebaum *et al*., 2004). The angiogenic effects are mediated mainly by two receptors. VEGF-R2 (Flk-1) plays a crucial role in endothelial cell proliferation, migration and vascular development, whereas VEGF-R1 modulates proliferation. The neuronal Flk-1 seems to be the main effector of VEGF-induced neuroprotection through the activation the PI-3 kinase/Akt survival pathway (Kilic *et al*., 2006). In adult rats, VEGF-R1 and VEGF-R2 are found on the surface of endothelial cells at very low levels. These receptors are both up-regulated at the surface of neurons and astrocytes after stroke (Lennmyr *et al*., 1998). Here, we observed a specific staining of Flk-1 in sprouting microvessels only in TLE. We detected no Flk-1 in neurons or glia. This suggests that this expression is a transient protective mechanism after an ischaemic or epileptic event.

Up-regulation of Tie-2 receptor

Angiopoietin 1 and 2 (Ang1, Ang2) are known to play a role in physiological or post-ischaemic angiogenesis in synergy with VEGF (Zhang and Chopp, 2002). We detected no angiopoietins, but we were able to observe an intense expression of their Tie-2 receptor in chronic TLE. When activated by Ang1, Tie-2 terminates angiogenesis and improves vascular integrity, mainly via the PI-3 kinase pathway (Eklund and Olsen, 2006). On the contrary, Ang2 behaves as an antagonist (Bogdanovic *et al*., 2006). Tie-2 staining was very scarce in NE patients and strong in short microvessels of all hippocampal areas in TLE patients, confirming the angiogenic sprouting. Moreover, Tie-2 was highly expressed by single cells, sometimes grouped in clusters along the vascular walls. Their localization and their phenotype is reminiscent of the recruitment of endothelial progenitor cells from peripheral circulation, which migrate to re-vascularize an ischemic tissue (Kopp *et al*., 2006). Therefore, the high quantity of Tie-2 positive cells provides further evidence of the persistence of angiogenic processes in the chronic focus.

What are the consequences of angiogenesis in the epileptic focus?

Neuroprotection

Generally, the rapid secretion of growth factors after seizures is considered as a protective mechanism. This is the case for VEGF release, since its anti-epileptogenic and neuroprotective properties were recently demonstrated both *in vitro* and *in vivo* (McCloskey *et al*., 2005).

Another effect of VEGF, that could be beneficial during seizures, is the fast adaptation of blood flow to the metabolic demand of neurons. VEGF, via the Flk-1/Akt pathway, activates the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) which promotes immediate vasodilatation through NO release (Ahmad *et al*., 2006). We previously showed that eNOS was over-expressed in microvessels of rat epileptic focus and that inhibiting NO synthesis dramatically worsened neuronal damage in kainate-induced SE (Rondouin *et al*., 1993; Lerner-Natoli *et al*., 1994).

Finally, the increased density of microvessels in the epileptic structures probably represents a progressive adaptation to improve perfusion during seizures. The ictal increase of both regional cerebral blood flow and metabolism during seizures, whatever aetiology or damage, is well-documented in humans (as illustrated in Fig. 5) and in different animal models (Lerner-Natoli *et al*., 1983; Pinard *et al*., 1987; Pereira de Vasconcelos *et al*., 2002; Van Paesschen, 2004).

BBB impairment

If, after an acute event such as a stroke, angiogenesis contributes to tissue revascularization, persistent angiogenic processes are considered to be deleterious for brain tissue, mainly due to BBB permeability (Hayashi *et al*., 2006). This is likely to be the case in chronic TLE and in different acute or chronic animal models of epilepsy. Single short seizures disrupt BBB (Goldman *et al*., 1987; Devanand *et al*., 1994; Oztas *et al*., 2003) and seizure frequency is correlated to the degree of leakage (Van Vliet *et al*., 2007). VEGF is known to play a main role in vascular permeability by activating matrix metalloproteases which break vessel walls (Hayashi *et al*., 2006) and degrade tight junctions (Zhang and Chopp, 2002). Our study on the rat model showed that IgG leakage and ZO-1 decrease were obvious early after SE, but also during latent and chronic periods. Since angiogenic factors are recurrently up-regulated by seizures, proteolytic processes would persist and contribute to the chronic impairment of the BBB.

IgG leakage

The extravasation of IgGs and other serum proteins which accumulate in the cytoplasm of neurons has already been reported in the case of acute BBB breakdown, auto-immune or neurodegenerative diseases (Kitz *et al*., 1984; Fabian and Petroff, 1987; Mori *et al*., 1991; Loberg *et al*., 1993; Orr *et al*., 2005; Hallene *et al*., 2006). We observed a neuronal uptake of IgGs in chronic TLE and the rat model showed that neurons were progressively affected in function of their vulnerability to seizures (first interneurons, then CA3/CA1 pyramidal neurons). An immune effect of IgGs on neuronal function has never been demonstrated in TLE, but the role of auto-antibodies in different forms of epilepsy is currently a matter of debate (McNamara, 2002; Watson *et al*., 2004; Roubertie *et al*., 2005). Nevertheless,

other serum proteins with no immune function are epileptogenic (Seiffert *et al.*, 2004). Recently, accumulation of albumin was described in the cytoplasm of neurons and astrocytes in human epilepsy or after an experimental BBB disruption (Van Vliet *et al.*, 2007). Its epileptogenic effect was demonstrated by Ivens *et al.* (2007) who showed that albumin uptake by astrocytes altered the potassium inward rectifying currents. Whether the accumulation of serum proteins in the interstitial space modifies oncotic pressure that contributes to vasogenic oedema and interictal hypoperfusion, remains to be elucidated.

Conclusion

The vascular remodelling described in this study is a common substrate for different forms of drug-refractory TLE and does not depend on their aetiologies. The hippocampus and other temporal structures of the epileptogenic network which show regional variations of blood flow are affected by neo-vascularization. Even if angiogenesis accounts for neuroprotective mechanisms during seizures, angiogenesis may be involved in the chronic permeability of the BBB with severe consequences, such as neurovascular uncoupling, inflammation and excitability. Future studies should focus on factors and signalling pathways involved in adult angiogenesis. By understanding the complex cross-talk between neurons, glia and endothelial cells, we may hope to develop novel therapeutic approaches of intractable epilepsy.

Supplementary Data

Supplementary Data is available at *BRAIN* online.

Acknowledgements

The authors are grateful to: Dr F. Bertaso for critically reading the manuscript, Dr G. Alonso for constructive discussions, A. Turner-Madeuf for language revision, L. Charvet for iconography and N. Lautredou-Audouy at the Centre Regional d'Imagerie Cellulaire for confocal microscopy. The technical assistance of L. Dumas, S. Lescure and D. Pierre in human histology was deeply appreciated. This study was supported by the French Foundation for Research on Epilepsy and the Foundation Thérèse and René Planiol for Research on Human Neuro-Vascular Pathologies.

References

Ahmad S, Hewett PW, Wang P, Al-Ani B, Cudmore M, Fujisawa T, et al. Direct evidence for endothelial vascular endothelial growth factor receptor-1 function in nitric oxide-mediated angiogenesis. Circ Res 2006; 99: 715–22.

Andre V, Ferrandon A, Marescaux C, Nehlig A. The lesional and epileptogenic consequences of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus are affected by previous exposure to isolated seizures: effects of amygdala kindling and maximal electroshocks. Neuroscience 2000; 99: 469–81.

Bogdanovic E, Nguyen VP, Dumont DJ. Activation of Tie2 by angiopoietin-1 and angiopoietin-2 results in their release and receptor internalization. J Cell Sci 2006; 119: 3551–60.

Bratz E. Ammonshornbefunde bei Epileptikern. Arch Psychiatr Nervenkr 1899; 32: 820–35.

Chabardes S, Kahane P, Minotti L, Tassi L, Grand S, Hoffmann D, et al. The temporopolar cortex plays a pivotal role in temporal lobe seizures. Brain 2005; 128: 1818–31.

Crespel A, Coubes P, Rousset MC, Alonso G, Bockaert J, Baldy-Moulinier M, et al. Immature-like astrocytes are associated with dentate granule cell migration in human temporal lobe epilepsy. Neurosci Lett 2002; 330: 114–8.

Crespel A, Rigau V, Coubes P, Rousset MC, de Bock F, Okano H, et al. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis 2005; 19: 436–50.

Croll SD, Goodman JH, Scharfman HE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in seizures: a double-edged sword. Adv Exp Med Biol 2004; 548: 57–68.

de Paz P, Barrio JP. Stereological parameters from the analysis of the cell micrographs either by manual point-counting methods or by using a semi-automatic system: a BASIC program for ZX-spectrum personal computer. Comput Biol Med 1985; 15: 153–8.

Devanand DP, Dwork AJ, Hutchinson ER, Bolwig TG, Sackeim HA. Does ECT alter brain structure? Am J Psychiatry 1994; 151: 957–70.

Duncan JS. Imaging and epilepsy. Brain 1997; 120 (Pt 2): 339–77.

Eid T, Lee TS, Thomas MJ, Amiry-Moghaddam M, Bjornsen LP, Spencer DD, et al. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K+ homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 1193–8.

Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. Exp Cell Res 2006; 312: 630–41.

Engel J Jr. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? Neuroscientist 2001; 7: 340–52.

Fabian RH, Petroff G. Intraneuronal IgG in the central nervous system: uptake by retrograde axonal transport. Neurology 1987; 37: 1780–4.

Gibbs FL, Lennox WG, Gibbs EL. Cerebral blood flow preceding and accompanying epileptic seizure in man. Arch Neurol Psychiatr 1934; 32: 257–72.

Goldman H, Berman RF, Murphy S. ACTH-related peptides, kindling and seizure disorders. Adv Biochem Psychopharmacol 1987; 43: 317–27.

Hallene KL, Oby E, Lee BJ, Santaguida S, Bassanini S, Cipolla M, et al. Prenatal exposure to thalidomide, altered vasculogenesis, and CNS malformations. Neuroscience 2006; 142: 267–83.

Hayashi T, Deguchi K, Nagotani S, Zhang H, Sehara Y, Tsuchiya A, et al. Cerebral ischemia and angiogenesis. Curr Neurovasc Res 2006; 3: 119–29.

Hellsten J, West MJ, Arvidsson A, Ekstrand J, Jansson L, Wennstrom M, et al. Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. Biol Psychiatry 2005; 58: 871–8.

Ivens S, Kaufer D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, et al. TGF-{beta} receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. Brain 2007; 130: 535–47.

Kann O, Kovacs R, Njunting M, Behrens CJ, Otahal J, Lehmann TN, et al. Metabolic dysfunction during neuronal activation in the ex vivo hippocampus from chronic epileptic rats and humans. Brain 2005; 128: 2396–407.

Kilic E, Kilic U, Wang Y, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood-brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. Faseb J 2006; 20: 1185–7.

Kitz K, Lassmann H, Karcher D, Lowenthal A. Blood-brain barrier in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: a correlative study between cerebrospinal fluid protein concentrations and tracer

leakage in the central nervous system. Acta Neuropathol 1984; 63: 41–50.

Kopp HG, Ramos CA, Rafii S. Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. Curr Opin Hematol 2006; 13: 175–81.

Lennmyr F, Ata KA, Funa K, Olsson Y, Terent A. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. J Neuropathol Exp Neurol 1998; 57: 874–82.

Lerner-Natoli M, de Bock F, Bockaert J, Rondouin G. NADPH diaphorase-positive cells in the brain after status epilepticus. Neuroreport 1994; 5: 2633–7.

Lerner-Natoli M, Le Ponçin-Laffite M, Rondouin G, Rapin J, Baldy-Moulinier M. Simultaneous determination of local cerebral blood flow and metabolism in the different stages of amygdala kindling. Cerebral blood flow, metabolism and epilepsy. London-Paris: John Libbey Eurotext; 1983.

Loberg EM, Karlsson BR, Torvik A. Neuronal uptake of plasma proteins after transient cerebral ischemia/hypoxia. Immunohistochemical studies on experimental animals and human brains. Apmis 1993; 101: 777–83.

McCloskey DP, Croll SD, Scharfman HE. Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. J Neurosci 2005; 25: 8889–97.

McNamara JO. B cells and epilepsy: the odd couple. Neurology 2002; 58: 677–8.

Mori S, Sternberger NH, Herman MM, Sternberger LA. Leakage and neuronal uptake of serum protein in aged and Alzheimer brains. A postmortem phenomenon with antemortem etiology. Lab Invest 1991; 64: 345–51.

Newton SS, Collier EF, Hunsberger J, Adams D, Terwilliger R, Selvanayagam E, et al. Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors. J Neurosci 2003; 23: 10841–51.

Newton SS, Girgenti MJ, Collier EF, Duman RS. Electroconvulsive seizure increases adult hippocampal angiogenesis in rats. Eur J Neurosci 2006; 24: 819–28.

Oommen KJ, Saba S, Oommen JA, Francel PC, Arnold CD, Wilson DA. The relative localizing value of interictal and immediate postictal SPECT in seizures of temporal lobe origin. J Nucl Med 2004; 45: 2021–5.

Orr CF, Rowe DB, Mizuno Y, Mori H, Halliday GM. A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. Brain 2005; 128: 2665–74.

Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, et al. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. J Clin Invest 2004; 113: 516–27.

Oztas B, Kaya M, Kucuk M, Tugran N. Influence of hypoosmolality on the blood-brain barrier permeability during epileptic seizures. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2003; 27: 701–4.

Pages G, Pouyssegur J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene–a concert of activating factors. Cardiovasc Res 2005; 65: 564–73.

Pereira de Vasconcelos A, Ferrandon A, Nehlig A. Local cerebral blood flow during lithium-pilocarpine seizures in the developing and adult rat: role of coupling between blood flow and metabolism in the genesis of neuronal damage. J Cereb Blood Flow Metab 2002; 22: 196–205.

Pinard E, Rigaud AS, Riche D, Naquet R, Seylaz J. Continuous determination of the cerebrovascular changes induced by bicuculline and kainic acid in unanaesthetized spontaneously breathing rats. Neuroscience 1987; 23: 943–52.

Rondouin G, Bockaert J, Lerner-Natoli M. L-nitroarginine, an inhibitor of NO synthase, dramatically worsens limbic epilepsy in rats. Neuroreport 1993; 4: 1187–90.

Roubertie A, Boukhaddaoui H, Sieso V, de Saint-Martin A, Lellouch-Tubiana A, Hirsch E, et al. Antiglial cell autoantibodies and childhood epilepsy: a case report. Epilepsia 2005; 46: 1308–12.

Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, et al. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. J Neurosci 2004; 24: 7829–36.

Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. Biochem Pharmacol 2000; 59: 47–53.

Spielmeyer W. Die Pathogenese des epileptisches Krampfes, histopathologischer Teil. Ztschr Neurol Psychiatr 1927; 109: 501–19.

Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. Bioessays 2004; 26: 943–54.

Tee MK, Jaffe RB. A precursor form of vascular endothelial growth factor arises by initiation from an upstream in-frame CUG codon. Biochem J 2001; 359: 219–26.

Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. Synapse 1989; 3: 154–71.

Van Paesschen W. Ictal SPECT. Epilepsia 2004; 45(Suppl 4): 35–40.

Van Vliet EA, Da Costa Araujo S, Redeker S, Van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. Brain 2007; 130: 521–34.

Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. Epilepsia 2005; 46: 1724–43.

Watson R, Jiang Y, Bermudez I, Houlihan L, Clover L, McKnight K, et al. Absence of antibodies to glutamate receptor type 3 (GluR3) in Rasmussen encephalitis. Neurology 2004; 63: 43–50.

Zhang Z, Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia. Trends Cardiovasc Med 2002; 12: 62–6.

ARTICLE 2

Age-dependent vascular changes induced by status epilepticus in rat forebrain: implications for epileptogenesis

Marcon J, Gagliardi B, Balosso S, Maroso M, Noé F, Morin M, Lerner-Natoli M, Vezzani A, Ravizza T

Neurobiol Dis. 2009 Apr;34(1):121-32

Neurobiology of Disease 34 (2009) 121–132

Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

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

Age-dependent vascular changes induced by status epilepticus in rat forebrain: Implications for epileptogenesis

Jessica Marcon [a,1], Barbara Gagliardi [a,1], Silvia Balosso [a], Mattia Maroso [a], Francesco Noé [a], Mèlanie Morin [b], Mireille Lerner-Natoli [b], Annamaria Vezzani [a,*], Teresa Ravizza [a]

[a] Department of Neuroscience, Laboratory of Experimental Neurology, Mario Negri Institute for Pharmacological Research, Via G. La Masa 19, 20156 Milano, Italy
[b] Institute of Functional Genomics, CNRS UMR5203, INSERM, U661, Université Montpellier, 1, 2, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 July 2008
Revised 28 November 2008
Accepted 30 December 2008
Available online 15 January 2009

Keywords:
Albumin
Angiogenesis
BBB
Inflammation
IL-1β
Status epilepticus

ABSTRACT

Brain inflammation, angiogenesis and increased blood-brain barrier (BBB) permeability occur in adult rodent and human epileptogenic brain tissue. We addressed the role of these events in epileptogenesis using a developmental approach since the propensity to develop spontaneous seizures, therefore the induction of epileptogenesis, is age-dependent and increases with brain maturation. Inflammation, angiogenesis and BBB permeability were studied in postnatal day (PN)9 and PN21 rats, 1 week and 4 months after pilocarpine-induced status epilepticus. Brain inflammation was evaluated by interleukin(IL)-1β immunohistochemistry; angiogenesis was quantified by measuring the density of microvessels identified by an anti-laminin antibody or by the intraluminal signal of FITC-albumin; BBB integrity was assessed by extravascular IgG immunostaining or detection of parenchymal extravasation of FITC-albumin. Neither inflammation nor angiogenesis or changes in BBB permeability were detected in PN9 rats after status epilepticus, and these rats did not develop spontaneous seizures in adulthood as assessed by video-EEG monitoring. Differently, status epilepticus in PN21 rats induced chronic inflammation, angiogenesis and BBB leakage in the hippocampus in 62% of rats, while in the remaining rats only transient inflammation in forebrain was observed. Epilepsy developed in about 62% of PN21 rats exposed to SE and these epileptic rats showed the three phenomena concomitantly in the hippocampus. PN21 rats that did not develop epilepsy 4 months after status epilepticus, as assessed by video-EEG monitoring, they did not show inflammation, angiogenesis or BBB damage in forebrain at this time. Our data show that age-dependent vascular changes and brain inflammation induced by status epilepticus are associated with epileptogenesis, suggesting that these phenomena are implicated in the mechanisms underlying the occurrence of spontaneous seizures.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Among the various molecular and structural modifications occurring in the adult rat brain during epileptogenesis, three processes have been recently identified, namely inflammation, changes in blood brain barrier (BBB) permeability properties and angiogenesis (Oby and Janigro, 2006; Ravizza et al., 2008a; Rigau et al., 2007; van Vliet et al., 2007). These events persist in experimental and human chronic epileptic tissue (Ravizza et al., 2008a; Rigau et al., 2007; van Vliet et al., 2007), and their concomitance suggests they may be closely interconnected. Thus, it has been demonstrated that inflammatory mediators such as IL-1β and TNF-α, that are produced by glial cells during seizures (Vezzani and Baram, 2007; Vezzani and Granata, 2005), possess angiogenic properties as demonstrated both *in vitro* (Dinarello, 1996) and following their intracerebral application in rat brain (Giulian et al., 1988; Naldini and Carraro, 2005). Inflammatory molecules can alter also the permeability properties of the BBB (Abbott, 2000; Allan et al., 2005; Oby and Janigro, 2006); in particular, IL-1β induces BBB leakage (Anthony et al., 1997; de Vries et al., 1996) *via* disruption of the tight-junction organization (Del Maschio et al., 1996) or the production of nitric oxide and activation of matrix metalloproteinases in endothelial cells (Allan et al., 2005). Finally, in adult epileptic rats and in human epileptogenic tissue, increased vascular density was found to be associated with areas of BBB damage (Rigau et al., 2007), consistent with the properties of angiogenic factors to increase vascular permeability (Nagy et al., 2008).

A mature vascular network is complete in rats around post-natal day (PN)20 (Carmeliet, 2005) and at full term in humans (Ballabh et al., 2005). However, during a life-time endothelial cells can proliferate in the brain resulting in the growth of new vessels as demonstrated under various disease conditions, such as in brain tumors, hypoxia/ischemia and epilepsy (Greenberg and Jin, 2005; Hellsten et al., 2005; Rigau et al., 2007). Although angiogenesis is

* Corresponding author. Fax: +39 2 35 46 277
E-mail address: vezzani@marionegri.it (A. Vezzani).
[1] These authors equally contributed to this study.
Available online on ScienceDirect (www.Sciencedirect.com).

0969-9961/$ – see front matter © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.nbd.2008.12.018

essential for organ growth and repair, an imbalance in this process may contribute to pathology (Carmeliet, 2005). Moreover, wiring of neuronal axons and blood vessels into functional circuits have been described during brain development (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005), suggesting that the formation of new vessels may affect also neuronal function.

Although the occurrence of inflammatory events, angiogenesis and BBB damage has been described in experimental models of seizures and in clinical cases of epilepsy (Ravizza et al., 2008a; Rigau et al., 2007; van Vliet et al., 2007), the contribution of these processes to epileptogenesis is still largely unexplored.

In this study, we addressed the role of these events in epileptogenesis induced by status epilepticus (SE) using a developmental approach. We took advantage of the knowledge that SE-induced epileptogenesis in rodents is age-dependent since it develops into recurrent spontaneous seizures only from PN12 onwards (Kubova et al., 2004; see review Scantlebury et al., 2007); moreover, only a percentage of PN21 rats develops spontaneous seizures after SE (Sankar et al., 1998; Roch et al., 2002). These features allowed us to evaluate the presence of inflammatory and vascular changes in forebrain areas of PN9 and PN21 rats *vis-à-vis* with their different propensity to develop epilepsy after SE.

Our data show the concomitant occurrence and persistence of these phenomena in the hippocampus only when epileptogenesis is induced and spontaneous seizures are established, thus highlighting the possibility that these events are implicated in the mechanisms leading to the onset of epilepsy after an initial precipitating event.

Materials and methods

Experimental animals

Male Sprague–Dawley rats (Charles River, Calco, Italy) at postnatal day (PN) 9 and 21 (with PN0 defined as the day of birth) were used. Rats were housed with their dams at constant temperature (23 °C) and relative humidity (60%) with a fixed 12 h light–dark cycle and free access to food and water. The pups were housed with their mother until weaning at PN21. Older animals were housed in groups of two to three per cage. For each experimental group, male pups were taken from three independent litters. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines that are in compliance with national (D.L.n.116; G.U., suppl.40, Feb. 18, 1992; UK legislation under the 1986 Animals Scientific Procedures Act) and international laws and policies (EEC Council Directive 86/609, OJ L 358, 1, Dec. 12, 1987; Guide for the Care and Use of laboratory Animals; U.S. National Research Council, 1996).

Lithium–pilocarpine injection

PN9 and PN21 rats were used since it is well established that the propensity to develop spontaneous seizures, therefore the induction of epileptogenesis in rodents is age-dependent (see for review Scantlebury et al., 2007). Thus, status epilepticus can trigger an epileptogenic process, which results in spontaneous recurrent seizures later in life, only in PN12 and older rats (Kubova et al., 2004; Scantlebury et al., 2007). Moreover, only a fraction of rats exposed to status epilepticus at PN21 develop spontaneous seizures when adult (Sankar et al., 1998; Roch et al., 2002; our own observations). Lithium chloride (3 meq/kg; Merck Sharp & Dohme, Rome, Italy) was intraperitoneally injected in PN9 and PN21 rats, 18–24 h before the subcutaneous injection of pilocarpine (60 mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Sankar et al., 1998). Controls were age-matched rats injected with lithium chloride and with an equivalent volume of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) instead of pilocarpine.

To maintain nest core temperature, PN9 rats were kept under a 60 Watt lamp during the experiment, and core temperature was measured before pilocarpine injection and 150 min and 6 h later (end of behavioral observation period, see below) using a temperature control unit HB101/2 RS equipped with rectal semi-flexible probe (Panlab, Cornellà, Spain). Before pilocarpine injection, core temperature ranged in PN9 rats from 34.1 °C to 35.4 °C ($n=50$), in accordance with a previous study (Auvin et al., 2007). Pilocarpine injection resulted in a moderate drop of core temperature by 150 min after its administration (range: 33.1 °C–34.3°C, $n=26$), while by 6 h this parameter returned to normotermic values (range: 34.3 °C–35.9 °C). In vehicle-injected rats, core temperature was at normotermic values (range 34.1 °C to 35.9 °C) at both time points (150 min and 6 h after vehicle injection, $n=24$).

PN9 rats were returned to their home cages with their respective dams 6 h after pilocarpine injection, at the end of the behavioral observation period.

In the attempt to improve the feeding and the hydration of the PN21 rats, at the end of the behavioral observation of status epilepticus, a mixture of crushed pellets in sucrose solution was positioned in a Petri dish inside the rat cages, up to 72 h after pilocarpine injection.

Quantitative evaluation of status epilepticus

Status epilepticus in PN9 and PN21 rats was visually observed for 6 h after pilocarpine injection by two independent investigators, and the onset and severity of behavioral manifestations were scored. We did not record EEG activity during status epilepticus in PN9 and PN21 rats, since the dose of pilocarpine injected in intact rats (60 mg/kg) caused death of all implanted animals, likely due to the increased BBB permeability consequent to mechanical damage by electrodes implantation, which may favor pilocarpine proconvulsant actions (Marchi et al., 2007a). Additionally, depth and cortical electrode implantation in the brain of these early postnatal and prepubescent rats compromises the quality of the histological preparations and precludes a sound quantitative analysis of our parameters (our preliminary observations).

Behavioral alterations induced by lithium–pilocarpine injection were age-dependent; to expose rats to a similar initial insult, at each age only rats with the same seizure severity score were used for subsequent analysis.

PN9

The first behavioral manifestations were observed at 4.4±0.3 min ($n=26$) from pilocarpine injection. Rats developed “hyperactivity followed by scratching, masticatory automatisms, head bobbing and tonic extension of the tail” (score 1) (Dubé et al., 1998); 9.1±0.9 min after pilocarpine administration, rats showed “body tremor and loss of postural control” (score 2); 89.6±5.7 min after pilocarpine injection, rats showed “permanent loss of postural control and sustained tremors of the paws” (score 3) (Dubé et al., 1998). This final stage was maintained until the end of the observation period (6 h). We did not observe generalized motor seizures at this age. Sixteen h after pilocarpine injection, PN9 rats were withdrawn from their cages and observed for 30 min; at this time, pilocarpine-injected rats fully recovered and their behavior was like that observed in vehicle-injected rats. These behavioral manifestations of status epilepticus observed in PN9 rats are in accordance with previous studies (Dubé et al., 1998; Hirsch et al., 1992). This pathological behavior was previously associated (Hirsch et al., 1992) with an electrographic status epilepticus characterized by “continuous generalized synchronous polyspikes and sharpe waves, occurring 60–80 min after pilocarpine administration, that last for about 3 h”, as assessed by EEG recordings in frontoparietal cortex and hippocampus. Two out of 26 rats died within 48 h from pilocarpine injection, the remaining 24 rats were used for histopathological analysis since they showed the same pattern of status

epilepticus (as assessed by onset time and duration of each behavioral stage), as above described.

PN21

The first behavioral manifestations were observed at 3.1 ± 0.2 (n = 54) from pilocarpine administration. Rats exhibited "head bobbing, scratching, masticatory automatisms, salivation and increased exploratory behavior" (score 1) (Dubé et al., 1998; Hirsch et al., 1992). Behavioral status epilepticus occurred at 8.8 ± 0.6 min after pilocarpine injection, and it was characterized by "continuous and sustained orofacial automatisms and bilateral forelimb clonus with rearing and falling (stages 4–5 of Racine's scale)" (score 2) lasting for the total time of observation (6 h). Rats showed behavior similar to vehicle-injected rats, 16 h after pilocarpine injection.

Ten out of 54 of pilocarpine injected rats died within 48 h; 3 out of 44 pilocapine-treated rats were excluded from subsequent histopathological evaluation since they did not reach behavioral status epilepticus (score 2); the remaining 41 rats were used for subsequent analysis.

Evaluation of the latency phase (epileptogenesis) in PN21 rats

We did not perform EEG analysis during the latency phase in the same PN21 rats undergoing histological evaluations to avoid compromising the quality of the histological preparations and preclude a sound quantitative analysis of our parameters (our preliminary observations). Thus, to demonstrate that PN21 rats were in their latency phase (absence of seizure activity) during the first week after status epilepticus, we used an additional group of PN21 rats (n = 8) exposed to status epilepticus in parallel with those PN21 rats undergoing histological evaluation. This "reference" group of rats was implanted with hippocampal electrodes (coordinates from bregma: mm, nose bar 0, AP −4.5, L ± 4.5 and 4.5 mm below dura mater; see below for details), 48 h after status epilepticus onset and they were continuously EEG recorded (24 h/day) from 72 h up to 1 week. Seizures did not occur in these rats throughout the period of EEG recording, thus confirming that 1 week represents the latency phase preceding the onset of spontaneous seizures at this age.

In the rats used for histophatological analysis but without EEG recordings, we carried out the immunohistochemical evaluation of c-*fos*, a well-established marker of neuronal activation and seizure activity (Morgan and Curran, 1991); these rats did not show any c-*fos* induction 1 week after pilocarpine injection, and they were similar to vehicle-injected rats (not shown).

Detection of recurrent spontaneous seizures in adulthood

Rats exposed to status epilepticus at PN9 (n = 5) and at PN21 (n = 6) underwent electrode implantation for EEG recordings in their adulthodd, thus 3 months after pilocarpine injection (Noé et al., 2008). Briefly, a ground lead was positioned over the nasal sinus, and two screw electrodes were placed bilaterally over the parietal cortex in adult rats deeply anaesthetized by Equithesin (1% pentobarbital/4% chloral hydrate; 3 ml/kg, i.p.). Bipolar nichrome wire-insulated electrodes (60 μm) were implanted bilaterally into the ventral hippocampus at the following coordinates from bregma: mm, nose bar −3.3, AP −4.7, L ± 5.0 and 5 mm below dura mater. The electrodes were connected to a multipin socket and were secured to the skull by acrylic dental cement. Five days after surgical procedures, EEG was recorded in freely-moving adult rats for 16 h/day (from 6 pm to 10 am) for 4 consecutive weeks to detect spontaneous seizures.

None of the rats treated with pilocarpine at PN9 (n = 5) developed spontaneous seizures. Five out of 8 rats injected with pilocarpine at PN21 developed spontaneous seizures after 3 months: 2 rats showed behavioral stage 5 seizures (Racine, 1972) during handling for cage cleaning, therefore they were not video-EEG recorded; the remaining 6 rats underwent video-EEG recording (see above) and spontaneous seizure were detected in 3 out of 6 rats. Chronic epileptic rats were killed 3 h after the last spontaneous seizure.

Immunohistochemistry

We used 5–8 rats in each experimental and control group. Three distinct sets of rats underwent different immunohistochemical procedures depending on the antigen to be detected. In particular, one set of rats was used to detect IL-1β, IgG and laminin in adjacent brain slices after transcardial perfusion of fixative. A second set of rats was sacrificed by decapitation after intracardiac injection of FITC-albumin in order to highlight the vascular network and analyze BBB integrity by detection of intraluminal *vs* parenchymal FITC-albumin signal. Finally, a third group of rats was decapitated, then the brains were post-fixed to perform VEGF immunostaining.

Four pilocarpine-injected rats and 4 vehicle-injected rats at each age (PN9 and PN21) were perfused (see below for details) 6 h after pilocarpine injection for immunostaining of the proto-oncogene c-*fos*, a well-established marker of neuronal activation (Morgan and Curran, 1991). c-*fos* was also evaluated in forebrain slices, in all rats used for histopathological analysis 1 week after SE (epileptogenesis phase, see above).

Transcardial perfusion

Rats were deeply anaesthetized using Equithesin and perfused via ascending aorta with 50 mM cold PBS (pH 7.4) followed by chilled 4% PAF in PBS. The brains were post-fixed for 90 min at 4 °C, then transferred to 20% (adult brain) or 30% (immature brain) sucrose in PBS for 24 h at 4 °C. The brains were immersed in −40 °C (immature brain) or −50 °C (adult rats) isopentane for 3 min and stored at −80 °C until assayed. Serial coronal sections (40 μm) were cut on a cryostat throughout the septal extension of the hippocampus (−2.3 to −3.8 mm from bregma) according to Paxinos and Watson (1986), and collected in 100 mM PBS. The septal hippocampus was selected since our previous studies in adult rats exposed to pilocarpine-induced SE showed that microvasculature changes were more pronounced there as compared to the temporal hippocampus (Rigau et al., 2007). We prepared 5 series of 7 sections each: the first section was stained for laminin, the 2nd for IgG, the 3rd for IL-1β, while the other sections were used for double-immunostaining analysis (see below for details). c-*fos* was analyzed in 2 slices in each brain in PN21 rats killed 1 week after SE while in 8 slices in each brain in PN9 and PN21 rats killed 6 h after SE.

IL-1β

IL-1β immunostaining was carried out as previously described (Ravizza et al., 2008a). Briefly, slices were incubated at 4 °C for 10 min in 70% methanol and 2% H_2O_2 in Tris–HCl-buffered saline (TBS), followed by 30 min incubation in 10% FCS in 1% Triton X-100 in TBS. The slices were then incubated overnight at 4 °C in the same medium with the primary antibody against IL-1β (1:200, Santa Cruz Bio., CA, USA). Immunoreactivity was tested by the avidin-biotin-peroxidase technique (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) using 3′,3′-diaminobenzidine (DAB; Sigma-Aldrich) as chromogen and the signal was amplified by nickel ammonium.

Laminin

Slices were incubated at room temperature for 10 min in 0.5% Triton X-100 in PBS followed by a overnight incubation at 4 °C in 3% foetal bovine serum (FBS) in 0.5% Triton X-100 in PBS. They were subsequently incubated overnight at 4 °C with the primary antibody against laminin (1:300, Sigma-Aldrich), one of the proteins of the basal membrane of the endothelial cells, in 3% FBS in 0.5% Triton X-100

in PBS. Immunoreactivity was tested as above but without signal amplification.

No immunostaining was observed by incubating the slices with the primary antibodies preabsorbed with the corresponding peptides, or without the primary antibodies (Bendfeldt et al., 2007; Ravizza et al., 2008a). At the end of immunohistochemical procedures, slices were mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated in graded alcohols, and coverslipped. The evaluation of IL-1β immunostaining was carried out by analysis of hippocampal subfields (CA1, CA3 pyramidal cell layer, and hilus), the frontoparietal cortex (motor area) and the amygdala at 10× and 20× magnification using a BX51 light microscope (Olympus, Hamburg, Germany).

IgG

A direct staining using a biotinylated anti-rat IgG antibody was used; this technique allows to detect IgG extravasation in the parenchyma or its cellular uptake as an index of BBB damage. Immunoreactivity was tested as described above. In addition, sections were counterstained with Haematoxylin–Eosin (HE) to verify whether IgG-positive neurons were eosinophilic. For this purpose, sections stained with anti-IgG antibody and counterstained with HE, were observed both at light and fluorescence microscopy. We superimposed images of fluorescent Eosin emission and brightfield images of brown IgG staining, as previously described by Rigau et al. (2007). HE staining and IgG immunohistochemistry revealed by peroxidase were observed with a BX61 microscope equipped for epifluorescence (Olympus).

c-fos

Slices were incubated at room temperature for 30 min in 0.3% H_2O_2 in PBS followed by a 2 h incubation in 3% FBS in 0.25% Triton X-100 in PBS. They were subsequently incubated 48 h at 4 °C with the primary antibody against c-*fos* (1:10 000, Oncogene, Cambridge, MA, USA), a marker of neuronal activation, in 3% FBS in 0.25% Triton X-100 in PBS. Immunoreactivity was tested as above using signal amplification.

Colocalisation studies were carried out to investigate the presence of IL-1β or IgG in glia and neurons: after incubation with the primary antibody against IL-1β, slices were incubated in biotinylated secondary anti-goat antibody (1:200, Vector Labs), then in streptavidin-HRP and the signal was revealed with tyramide conjugated to Fluorescein using TSA amplification kit (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA); for IgG, sections were incubated with an anti-rat antibody conjugated with Alexa488 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Sections were subsequently incubated with the following primary antibodies: mouse anti-CD11b (complement receptor type 3, OX-42, 1:100, Serotec Ltd, Oxford, UK), a marker of microglia-like cells; mouse anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:2500, Chemicon Int. Inc., Temecula, USA), a selective marker of astrocytes; mouse anti-neuronal specific nuclear protein (NeuN, 1:1000, Chemicon), a selective neuron marker. Fluorescence was detected using anti-mouse or anti-rat secondary antibodies conjugated with Alexa546 (Molecular Probes, The Netherlands). Slide-mounted sections were examined with an Olympus Fluorview laser scanning confocal microscope (microscope BX61 and confocal system FV500) using dual excitation of 488 nm (Laser Ar) and 546 nm (Laser He-Ne green) for Fluorescein and Alexa546, respectively. The emission of fluorescent probes was collected on separate detectors. To eliminate the possibility of bleed-through between channels, the sections were scanned in a sequential mode.

FITC-albumin injection

Additional groups of PN9 and PN21 rats and their controls were deeply anaesthetised with Equithesin 1 week after SE, and after skin incision fluorescent dye solution (FITC-albumin, 10 mg/ml in buffered saline, Sigma-Aldrich) was injected into the ascending aorta at 1 ml/min (10 ml/kg) as previously described (Marchi et al., 2006). Five min after injection, rats were killed by decapitation and their brains were immersion-fixed for 48 h in 4% PAF in 0.05 M PBS, pH 7.4, cryoprotected overnight in 20% sucrose in PBS, frozen at −40 °C in isopentane and stored at −80 °C. Coronal sections (40 μm) were cut on cryostat throughout the septal extension of the hippocampus as described above, then collected on gelatin-coated slides and coverslipped. Ten sections were analyzed for each rat (1 every 4) by confocal microscopy (Olympus Fluorview laser scanning confocal microscope, see above for technical details) to assess the intraluminal *vs* extravascular FITC-albumin signal.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression

An additional set of rats was killed by decapitation under deep Equithesin anaesthesia and their brains were immersed and stored in 4% PAF until assay. We cut coronal sections throughout the septal extension of the hippocampus (−2.3 to −3.8 mm from bregma), according to Paxinos and Watson (1986). One emisphere was cut into 4 μm paraffin sections for neuronal VEGF quantification, and the other into 40 μm sections with a vibratome for double and triple immunostaining. Immunohistochemistry was carried out as previously described (Rigau et al., 2007). Sections were incubated at room temperature for 2 h in 10% normal swine serum (NSS) in 0.25% Triton X-100 in PBS, then incubated 18 h at 4 °C with the primary antibodies against goat polyclonal anti-VEGF (1:200, Santa Cruz), mouse monoclonal anti-NeuN (1:500, Chemicon), rabbit anti-GFAP (1:500, Dako, Glostrup, Denmark), mouse monoclonal anti-OX-42 (1:200, Serotec). After washing steps, sections were incubated in PBS containing secondary antibodies raised in donkeys against rabbit, goat or mouse IgGs, conjugated to Cy3 (1:2000, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) Alexa488, Alexa350 or Alexa647 (1:2000, Molecular Probes). Double or triple-labeled sections were observed using a confocal microscope (Olympus Fluorview laser scanning confocal microscope, see above for technical details). We used an argon laser for Alexa488, a helium laser for Texas Red and a krypton–argon laser for Alexa647. Images were collected sequentially to avoid cross-contamination between fluorochromes.

Quantification procedures

Cell counting

Cell counting was performed as described by Rigau et al. (2007) and Ravizza et al. (2008a) in CA1, CA3 pyramidal cell layers and the hilus of the hippocampus. Images at 20× magnification were acquired (0.1 mm^2 each area analyzed), and digitized.

Astrocytes

Using 3 double-labeled slices for VEGF/GFAP per rat (5 rats in each experimental group), the total number of cells stained with GFAP as well as the number of cells double-labeled for VEGF and GFAP was counted. Data obtained in each hippocampal subfield per slice were added together providing a single value for each slice. Values of 3 slices per rat were averaged and this value was used for statistical analysis. Although this cell counting method has some limitations as compared to designed-based stereological analysis (Schmitz and Hof, 2005), the occurrence of any bias in counting should similarly affect control and experimental samples since these samples underwent the same methodological procedures in parallel.

Neurons

Since VEGF was expressed in the majority of hippocampal pyramidal neurons in control slices, changes in VEGF expression following seizures are likely to be determined by modifications in its expression levels within neurons rather than by changes in the number of neurons expressing this peptide. Thus, we used an optical

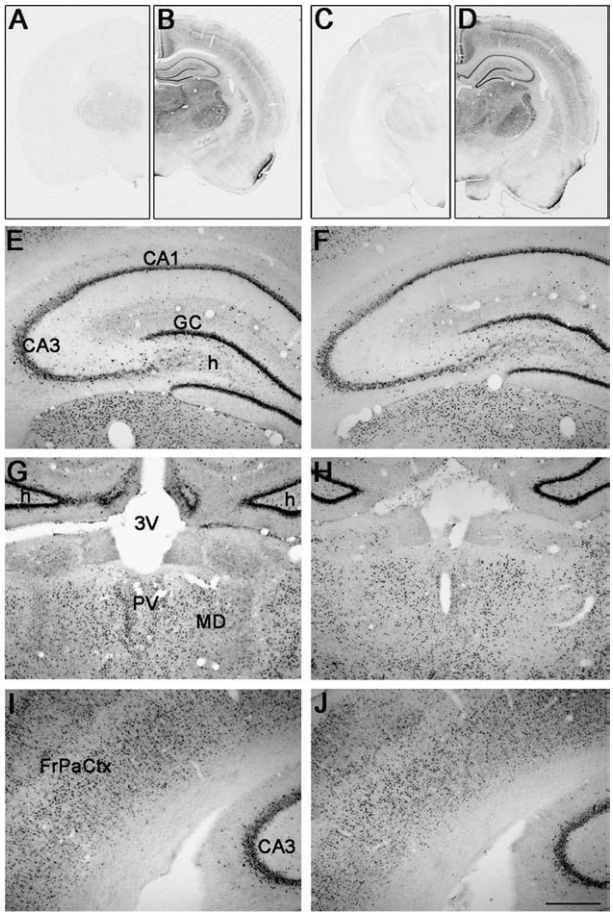


Fig. 1. c-*fos* expression in the rat forebrain of PN9 and PN21 rats, 6 h after pilocarpine injection. Representative micrographs of brain sections from PN9 (A, B, E, G, I) and PN21 (C, D, F, H, J) rats, 6 h after pilocarpine injection (end of observation period of status epilepticus; see text for details). At both postnatal ages, vehicle-injected rats were devoid of c-*fos* immunostaining (A, C). In PN9 (B, E, G, I) and PN21 (D, F, H, J) pilocarpine-injected rats, strong c-*fos* induction was observed in the granule cell and the pyramidal cell layers of the hippocampus (B, E and D, F), the thalamic nuclei (G, H) and the frontoparietal cortex (I, J). Note that the pattern of c-*fos* immunostaining after pilocarpine was similar at both postnatal ages (see for comparison B *vs* D). Scale bar: A–D 2.3 mm; E–J 200 μm. GC, granule cell layer; CA, pyramidal cell layer; h, hilus; 3V, third ventricle; PV, paraventricular thalamic nuclei; MD, mediodorsal thalamic nuclei; FrPaCtx, frontoparietal cortex.

density (OD) measure rather than cell counting. For each rat, 3 sections (4 μm-thick) were double-labeled with VEGF/NeuN. We selected the neuronal layers in the digitized images based on NeuN staining, and we converted VEGF immunofluorescent staining into gray scale to measure the mean OD in a given area using ImageJ (NIH). The values of OD obtained in each hippocampal subfield per slice were added together providing a single value for each slice. Values of 3 slices per rat were averaged and this value was used for statistical analysis.

Vessels

Microvessel counting was performed as previously described by Bendfeldt et al. (2007) in CA1, CA3 pyramidal layers and the hilus of the hippocampus, the frontoparietal cortex and the basolateral amygdala. Images at 2× magnification (frontoparietal cortex and amygdala), or high-power non-overlapping fields of the hippocampus (10× magnification; BX61 microscope equipped with motorized platform, Olympus) were acquired. Digitalized images were overlayed with a grid (100×100 μm per single square; total field in each area 1 mm^2; AnalySIS, Soft Imaging System, Olympus). The vascular network, visualized with anti-laminin immunostaining, or with the intraluminal signal of FITC-albumin, was quantified by counting the number of vessels crossing the grid. All individual crossings were marked by the operator, and an automated vessel count was generated (AnalySIS, Olympus). Two sections at different antero-posterior level of the septal hippocampus per rat were analyzed (1 section at −2.8 and 1 section at −3.8 mm from bregma). Data obtained in each hippocampal subfield per level were added together providing a single value per each rat that was used for statistical analysis. Data obtained in frontoparietal cortex and amygdala per level were directly used for statistical analysis.

Immunohistochemical analysis of brain sections and quatification procedures were performed by two independent investigators blind to the identity of the samples.

Statistical analysis of data

Data are mean±SE (n=number of rats). Wilcoxon rank sum test was used for comparison of experimental and control groups.

Results

All rats used for immunohistochemical evaluation at each postnatal age experienced behavioral status epileptics of similar severity (see Materials and methods section for details).

To show that forebrain neuronal activation during status epilepticus was similar in all the injected PN9 or PN21 rats, we performed immunohistochemical c-*fos* analysis, 6 h after pilocarpine injection. Fig. 1 shows lack of c-*fos* staining in PN9 (A) and PN21 (C) control rat brain while it was strongly increased at both ages after pilocarpine-induced status epilepticus in all hippocampal subfields (B, E and D, F) and extrahippocampal forebrain regions (G–J), and this induction was similar in all animals analyzed.

Status epilepticus in PN9 rats

Inflammation

In pilocarpine-treated rats killed 1 week (Fig. 2B, n=5) or 4 months (n=5, not shown) after SE, the pattern of IL-1β expression was similar to that observed in control rats (Fig. 2A; n=5): in the hippocampus scattered neurons in the pyramidal cell layer showed low level of immunoreactivity; in frontoparietal cortex and amygdala IL-1β immunoreactivity was not detectable (not shown).

BBB permeability

FITC-albumin. In control hippocampus (n=5), FITC-albumin signal was visible intraluminally, thus indicating preservation of BBB permeability (Fig. 3A); 1 week after SE, no parenchymal extravasation of FITC-albumin was found (Fig. 3B; n=5). In frontoparietal cortex and amygdala of control rats, FITC-albumin was detected around scattered vessels indicating an incomplete maturation of the BBB in these brain areas (Schulze and Firth, 1992), and this pattern was similar to that observed in pilocarpine-treated rats (not shown).

IgG. We did not observe any IgG staining in the hippocampus in control conditions (Fig. 4A) or 1 week (Fig. 4B; n=5) and 4 months (not shown; n=5) after SE, thus confirming the integrity of the BBB in these experimental conditions. Similar results were obtained in extrahippocampal areas (not shown).

Angiogenesis

Using FITC-albumin intravascular signal as a marker of the vascular network, the density of microvessels in the hippocampus evaluated 1 week (Fig. 3B; n=5) after SE was similar to control rats (Fig. 3A, for quantification see bargram in C; n=5). Accordingly, no changes were found between controls (Fig. 3D; n=5) and pilocarpine-treated rats

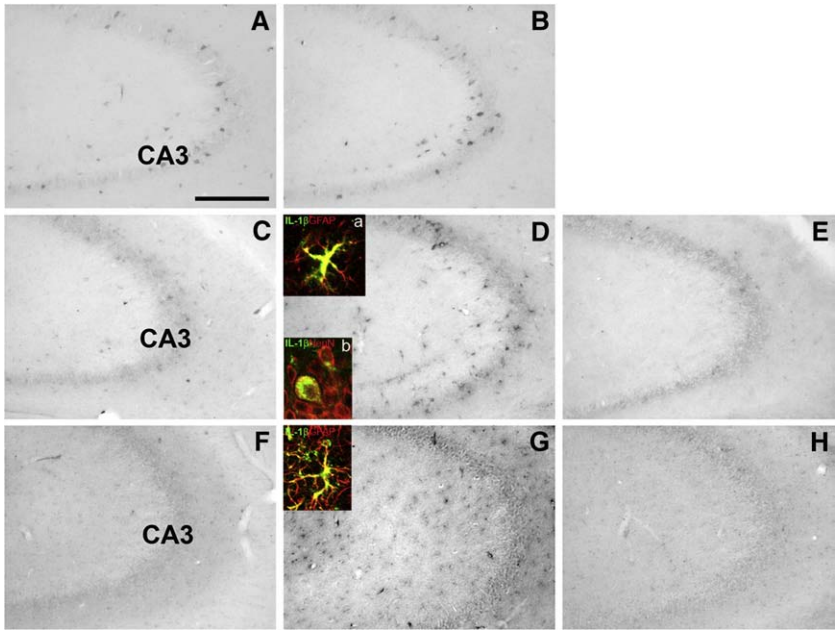


Fig. 2. IL-1β expression in the rat hippocampus of PN9 and PN21 rats after status epilepticus. Representative micrographs of hippocampal sections from PN9 (A, B) and PN21 (C–H) rats, 1 week (B, D, E) and 4 months (G, H) after SE. Panels A, C, F represent age-matched control sections. Sections from PN9 rats killed 1 week after SE (B; $n=5$) were similar to control sections (A; $n=5$): IL-1β immunoreactivity was detectable in scattered neurons of the pyramidal cell layers. In 5 out of 8 PN21 rats killed 1 week after SE (D), increased IL-1β immunoreactivity was found in astrocytes (D, inset a) and in scarse neurons (D, inset b). In the remaining 3 PN21 rats, IL-1β immunoreactivity was similar to control sections (E *vs* C). Four months after SE induced in PN21 rats, IL-1β was enhanced in astrocytes only in those rats developing spontaneous seizures (G and its inset; 5 out 8 rats) while immunoreactivity was similar to control sections in non-epileptic rats (H; 3 out 8 rats). Scale bar: A–H 100 μm; insets in D, G: 25 μm. CA, pyramidal cell layer.

(Fig. 3E; $n=5$) when laminin was used to quantify vessel density (Fig. 3 bargram in F; $n=5$). No changes were found in frontoparietal cortex and amygdala (not shown).

VEGF expression

In control hippocampus, VEGF immunoreactivity was found in neurons (Fig. 3G) and in astrocytes (Fig. 3J). One week after SE, VEGF levels were increased by 55% in neurons (control: 100±3.4%; pilocarpine: 155.5±14.8%*; Fig. 3H *vs* G; bargram in I; $p<0.05$ by Wilcoxon rank sum test; $n=5$). The percentage of VEGF-immunostained astrocytes in the same slices did not change after SE (control: 35.7±2.6%; pilocarpine: 40.4±7.8%; Fig. 3K *vs* J; bargram in L). No VEGF immunostaining was observed in microglia-like cells (not shown). No obvious signs of activation were observed in astrocytes and microglia (swelling, changes in size or shape) in controls and pilocarpine-injected rats.

Status epilepticus in PN21 rats

Inflammation

In the hippocampus of PN21 control rats ($n=5$), IL-1β immunoreactivity was barely detectable (Fig. 2C). In 62% of PN21 pilocarpine-treated rats killed 1 week after SE (5 out 8 rats), IL-1β was highly expressed by astrocytes (Fig. 2D, inset a) and in scattered neurons (Fig. 2D, inset b). In the remaining 3 out 8 rats, the pattern of IL-1β expression was similar to controls (Fig. 2E). In the hippocampus of adult rats exposed to SE at PN21 (i.e. 4 months after SE, $n=8$), IL-β immunostaining was increased in glial cells only in those rats that developed spontaneous seizures (62%, 5 out 8 rats; Fig. 2G). In rats that did not develop spontaneous seizures (3 out 8 rats) (Fig. 2H), the pattern of IL-1β expression was similar to controls (Fig. 2F).

BBB permeability

FITC-albumin. In control hippocampus ($n=5$), only intraluminal FITC–albumin signal was visible (Figs. 5A–C, panel a); in 62% of pilocarpine-treated rats killed 1 week after SE onset, a widespread parenchymal extravasation of FITC-albumin was observed in the pyramidal cell layer, hilus and stratum molecolare (5 out 8 rats; Figs. 5D–F *vs* A–C, panel a). In the remaining 3 out of 8 rats, mild parenchymal extravasation of FITC-albumin was found only in the stratum molecolare (Fig. 5I *vs* C, panel a). In frontoparietal cortex and amygdala of control rats, FITC-albumin signal was exclusively observed intraluminally while after SE a pronounced FITC-albumin extravasation was found (not shown).

IgG. No IgG staining was detected in the hippocampus of PN21 control rats (Fig. 4C; $n=5$) while 62% of pilocarpine-treated rats killed 1 week after SE onset (5 out of 8 rats), showed neuronal IgG staining (Fig. 4D, inset c) in slices adjacent to those showing increased IL-1β (see Fig. 2D). Counterstaining of slices with HE showed uptake of extravasated IgG in eosinophylic neurons (Fig 4D, insets a,b). The remaining pilocarpine-treated rats (3 out of 8 rats) showed a pattern of IgG (Fig. 4E) and IL-1β staining (Fig. 2E) similar to controls (Fig. 4C). A pattern of neuronal IgG staining similar to that described in the hippocampus was found in frontoparietal cortex and amygdala; however, additional IgG staining in parenchymal and perivascular astrocytes was observed in amygdala (not shown).

Rats exposed to SE at PN21 ($n=8$) that developed spontaneous seizures in adulthood (5 out 8 rats), showed pronounced perivascular IgG staining (Fig. 4G and inset) in the same areas of increased IL-1β immunoreactivity (Fig. 2G) as detected in adjacent slices; neither perivascular IgG staining (Fig. 4H) or IL-1β induction (Fig. 2H) was observed in adult non-epileptic rats (3 out 8) similarly to control rats (Fig. 4F).

Angiogenesis

Using intravascular FITC-albumin signal to detect brain vessels (Fig. 5, panel a), 62% of PN21 pilocarpine-treated rats killed 1 week after SE (5 out of 8 rats; Figs. 5D–F, panel a) showed a 30% increase in microvessels density in the hippocampus (bargram in panel a; $p<0.05$ by Wilcoxon rank sum test) as compared to control rats (Figs. 5A–C,

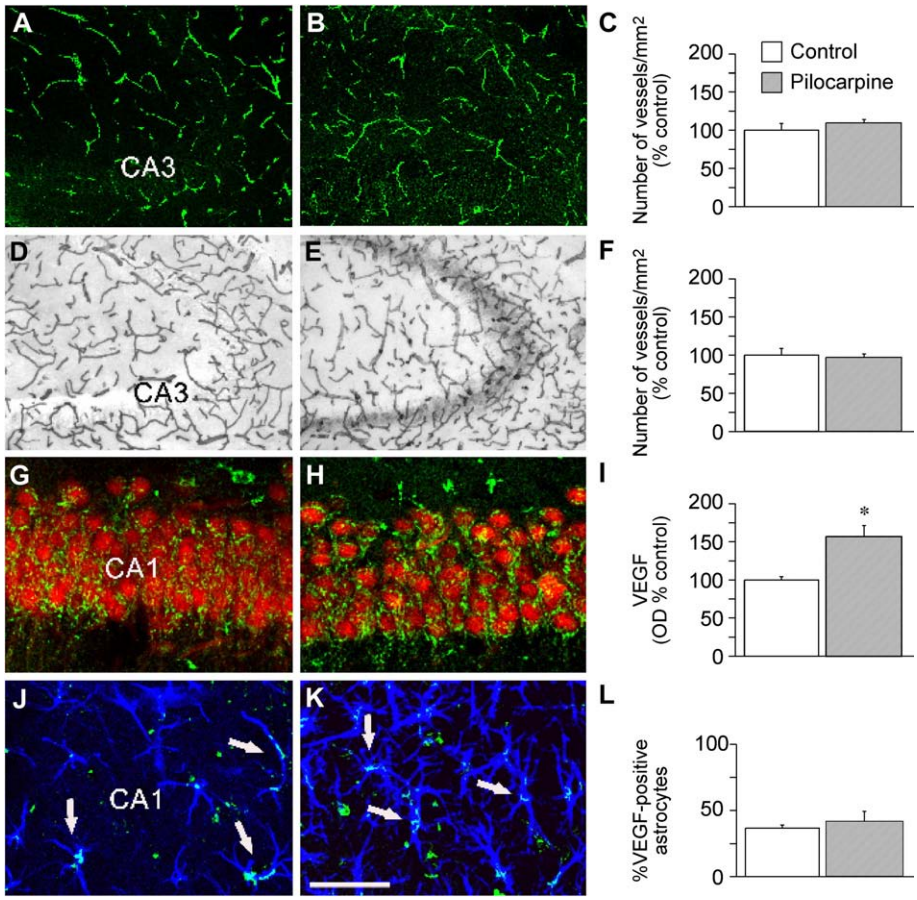


Fig. 3. Microvessels density, BBB permeability, and VEGF expression in the hippocampus of PN9 rats, 1 week after status epilepticus. *Microvessels* (Panels A–E). Representative hippocampal sections from control (A, D; $n=5$) and pilocarpine-treated rats (B, E; $n=5$) evaluated with FITC-albumin (A, B) or laminin (D, E) signal. Note that FITC-albumin signal was visible only intraluminally (A, B), thus indicating preservation of BBB permeability function. The density of microvessels (mean ± SE, $n=5$) as assessed either by intravascular FITC-albumin (bargram in C) or laminin immunoreactivity (bargram in F) showed no significant changes after status epilepticus as compared to control rats. *VEGF* (Panels G–K). In control hippocampus (G, J; $n=5$), VEGF immunostaining (green signal) was found in neurons (NeuN, red signal in G) and astrocytes (GFAP, blue signal in J). VEGF levels increased in neurons after status epilepticus in all rats ($n=5$) as compared to controls (H *vs* G; quantification in I; $p<0.05$ by Wilcoxon rank sum test), while the percentage of astrocytes expressing VEGF did not change (arrows in J, K and quantification in L). Scale bar: A, B, D, E: 100 μm; G, H, J, K 50 μm. CA, pyramidal cell layer.

panel a). Pronounced extravasation of FITC-albumin was detected in the areas of increased vessel density (Figs. 5D–F, panel a). Three out of 8 pilocarpine-treated rats (Figs. 5G–I) showed vessel density in the hippocampus similar to control rats (Figs. 5A–C) and only mild FITC-albumin extravasation (Fig. 5I, panel a). All pilocarpine-injected rats, showed a 30–38% increase in vessel density in frontoparietal cortex (control: 100 ± 3.7%; pilocarpine: 138 ± 10%*) and amygdala (control: 100 ± 1.7%; pilocarpine: 130 ± 6.9%*) associated with increased BBB permeability to FITC-albumin (not shown; $p<0.05$ by Wilcoxon rank sum test).

Using laminin to detect vessels, an average 15% increase in microvessel density was measured in the hippocampus in 5 out 8 pilocarpine-treated rats killed 1 week after SE (Figs. 5D–F, panel b) as compared to control rats (Fig. 5A–C and bargram in panel b; $p<0.05$ by Wilcoxon rank sum test). IL-1β induction (Fig. 2D) and BBB damage (Fig. 4D) were detected in adjacent brain sections. An average 13–20% increase in vessel density was found in frontoparietal cortex (control: 100 ± 4.1%; pilocarpine: 113.5 ± 0.8%*) and amygdala (control: 100 ± 2.5%; pilocarpine: 120.7 ± 3.9%* ($p<0.05$ by Wilcoxon rank sum test, not shown). In the remaining 3 out of 8 pilocarpine-treated rats, the density of microvessels in the hippocampus was similar to control rats (Figs. 5G–I *vs* A–C and bargram in panel b) and in extrahippocampal areas (not shown), and these rats did not show either IL-1β induction (Fig. 2E) or BBB damage (Fig. 4E), as assessed in adjacent brain slices.

We found an average 35% increase in microvessel density in rats exposed to SE at PN21 ($n=8$) that developed spontaneous seizures in adulthood (Figs. 6D–F; 5 out of 8 rats), as compared to control rats (Figs. 6A–C; bargram in Fig. 6, $p<0.05$ by Wilcoxon rank sum test). This increase occurred in the same areas showing IL-1β expression (Fig. 2G) and BBB damage (Fig. 4G). We found in the same rats an average 10% increase in vessel density in frontoparietal cortex (control: 100 ± 3.1%; pilocarpine: 109.5 ± 1.6%) and amygdala (control: 100 ± 2.2%; pilocarpine: 110.6 ± 2.6%*) ($p<0.05$ by Wilcoxon rank sum test). In adult non-epileptic rats (Figs. 6G–I; 3 out of 8 rats), the number of vessels was similar to controls both in the hippocampus (Figs. 6A–C; bargram in Fig. 5) and in extrahippocampal regions (not shown), and these rats did not show increases in IL-1β (Fig. 2H) or BBB damage (Fig. 4H).

VEGF expression

In control hippocampus ($n=5$), VEGF immunoreactivity was found in neurons (Fig. 7A) and in astrocytes (Fig. 7D). One week after SE ($n=5$), VEGF levels increased by 36% in neurons in all rats evaluated (control: 100 ± 4.0%; pilocarpine: 136.5 ± 5.3%*; Fig. 7A–B, bargram in C; $p<0.05$ by Wilcoxon rank sum test). Differently, two groups of pilocarpine-injected rats were identified when assessing the astrocytic expression of VEGF. In particular, the percentage of VEGF-immunopositive reactive astrocytes (showing hypertrophic cell bodies

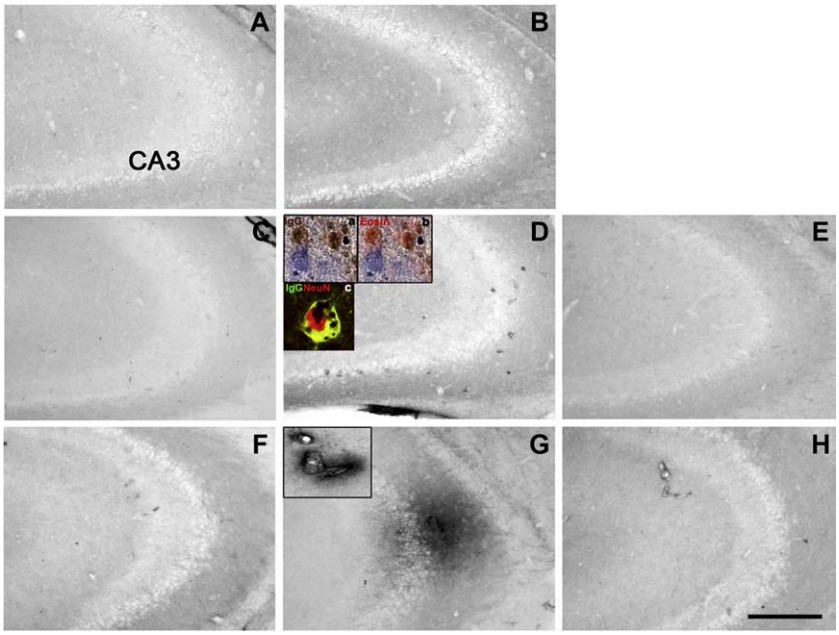


Fig. 4. Immunohistochemical detection of IgG in the rat hippocampus of PN9 and PN21 rats after status epilepticus. IgG staining was not observed in brain parenchyma of control rats (A, C, F; $n=5$). No staining was detected in the hippocampus of PN9 rats killed 1 week after status epilepticus (B; $n=5$). In PN21 rats, we observed neuronal IgG staining (D) 1 week after status epilepticus in 5 out of 8 rats, in hippocampal slices adjacent to those displaying increased IL-1β in astrocytes (see Fig. 2D). Most of the IgG-immunoreactive neurons were eosinophilic (D, insets a–b) as assessed in separate groups of rats ($n=5$). Colocalisation experiments confirmed that IgG were taken up by neurons (see yellow signal in D, inset c). In the remaining 3 out of 8 PN21 rats, no IgG staining was detected (E); these rats showed a pattern of IL-1β similar to controls (see Fig. 2E). Four months after status epilepticus induced in PN21 rats, parenchymal IgG staining was detected only in those rats that developed spontaneous seizures (G and its inset; 5 out 8 rats). No IgG staining was observed in the remaining non-epileptic rats (H; 3 out of 8 rats). Scale bar: A–H 100 μm; insets in D: 25 μm. CA, pyramidal cell layer.

and thick processes) was increased after SE in 3 out 5 rats (control: 47.6±5.7%; pilocarpine: 83.9±3.9%*; Fig. 7E *vs* D, bargram in G; $p<0.05$ by Wilcoxon rank sum test) while in the remaining 2 rats no changes were observed as compared to controls (Fig. 7F *vs* D, bargram in G). In rats with reactive astrocytes, we observed numerous hypertrophic microglia-like cells which did not express VEGF (not shown).

We did not detect any significant differences in the pattern of inflammation, or extent of angiogenesis and BBB damage among the chronic epileptic rats (2 rats with handling-induced behavioral seizures vs 3 rats with video-EEG recorded seizures).

Discussion

Understanding the mechanisms underlying epileptogenesis is critical to discover new therapeutic targets for interfering with the disease progression. Using a SE model of epileptogenesis in developing rats, we studied three processes occurring concomitantly in the hippocampus of temporal lobe epilepsy (TLE) patients, namely inflammation (as exemplified by IL-1β expression; Ravizza et al., 2008a), angiogenesis (Rigau et al., 2007) and alteration in BBB permeability (Oby and Janigro, 2006; van Vliet et al., 2007). It is well established that SE in rats causes epilepsy only when induced from PN12 onwards (Kubova et al., 2004; Scantlebury et al., 2007), therefore the age-dependent brain propensity to develop epilepsy after an initial precipitating event (see also Sankar et al., 1998; Roch et al., 2002), provides a tool to investigate the involvement of these processes in the onset of spontaneous seizures.

Our data show that inflammation and microvasculature changes are induced by SE in PN21 but not in PN9 rats, therefore only in animals prone to epileptogenesis, and showing spontaneous seizures in adulthood, as assessed by video-EEG recordings. Our previous evidence showed that inflammation occurs in all PN21 rats undergoing SE, as assessed 4 h and 24 h after SE onset (Rizzi et al., 2003), while in the present study only 62% of PN21 rats show inflammation 1 week after SE. This evidence indicates that inflammation becomes self-sustained and chronic only in a fraction of animals, which matches with the proportion of PN21 rats developing epilepsy in adulthood. Using immunohistochemical approaches, we found a strict concomitance and regional association between inflammation and microvasculature changes in the hippocampus and extrahippocampal areas supporting that these events are closely related to each others. Previous evidence showed that proinflammatory cytokines such as IL-1β may increase BBB permeability and promote angiogenesis (see Introduction). We recently found that SE in adult rats, resulting in the development of epilepsy in ≥90% of the animals (Priel et al., 1996; Ravizza et al., 2008a), induces chronic inflammation, angiogenesis and BBB opening during epileptogenesis which persist in chronic epileptic tissue, and the onset of inflammation precedes the changes in microvasculature (De Simoni et al., 2000; Ravizza et al., 2008a; Rigau et al., 2007; van Vliet et al., 2007). These findings suggest that SE-induced cytokines production in epileptogenic tissue (De Simoni et al., 2000; Ravizza et al., 2008a, and present study) is responsible for the microvasculature changes observed during epileptogenesis. IL-1β also activates hypoxia-inducible factor 1-α (HIF)/VEGF axis (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005) in cerebral cortex and this action results in increased BBB permeability in this area (Argaw et al., 2006), and promotes angiogenesis *in vivo* (Naldini and Carraro, 2005). Accordingly, intracerebral application of IL-1β in adult rats induces new blood vessel growth in the cerebral cortex (Giulian et al., 1988), indicating that this cytokine indeed elicits angiogenic effects in the brain. VEGF besides promoting angiogenesis can activate matrix metalloproteinases resulting in the proteolytic processing of the basal membrane and interstitial matrix (Hallmann et al., 2005). Our data support these observations since we found that VEGF and IL-1β increase in astrocytes in areas of increased vessel density and BBB leakage. These phenomena occur in the same proportion of PN21 rats which develop epilepsy, while none of these alterations were found in

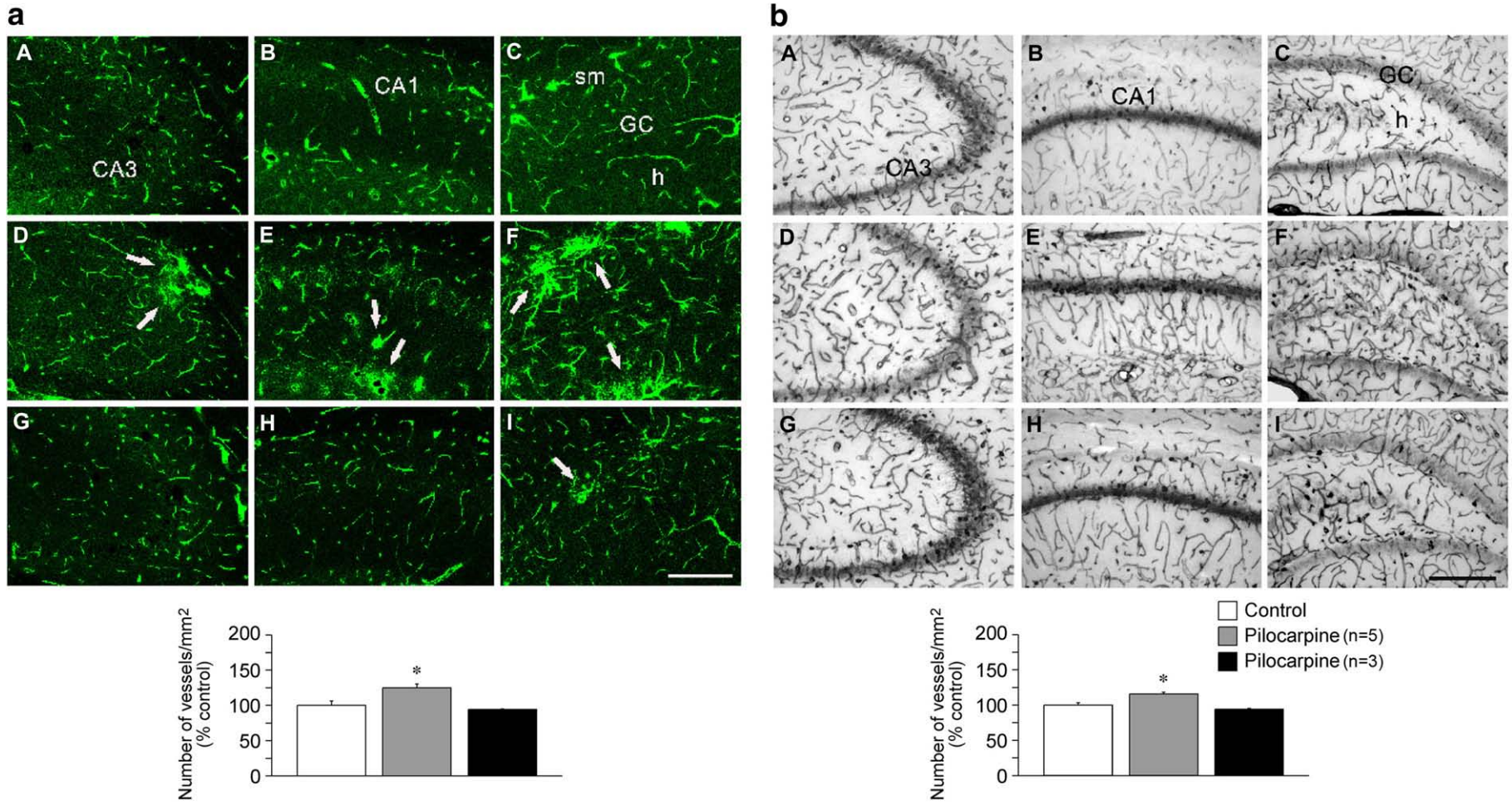


Fig. 5. Microvessels density and BBB permeability in the rat hippocampus of PN21 rats, 1 week after status epilepticus. Panel a: In control hippocampus, only intraluminal FITC-albumin signal was visible (A–C; $n=5$) denoting preservation of BBB permeability properties. In 5 out 8 pilocarpine-treated rats, a widespread parenchymal extravasation of FITC-albumin was observed in all hippocampal subfields (arrows in D–F) while in the remaining 3 rats (G–I), a modest leakage was found in stratum molecolare only (arrow in I). Bargram shows (mean ± SE, $n=3$–5) increased density of microvessels in rats with diffuse BBB damage (D–F; $n=5$, gray bar, $p<0.05$ vs control by Wilcoxon rank sum test), while the rats with modest FITC-albumin extravasation (G–I, $n=3$, black bar) did not show significant changes in vessels density. Panel b: Representative micrographs of laminin immunostaining depicting the vascular network in control (A–C; $n=5$) and experimental (D–I; $n=8$) rats. In 5 out 8 pilocarpine-treated rats, there was an increased vessel density (D–F *vs* A–C; gray bar in bargram), while in the remaining 3 rats no changes in vessel density were noted (G–I *vs* A–C; black bar in bargram). Bargram shows (mean ± SE, $n=3$–5) the quantification of microvessels density in the hippocampus ($p<0.05$ vs control by Wilcoxon rank sum test). Scale bar: 100 μm. GC, granule cell layer; CA, pyramidal cell layer; sm, stratum molecolare; h, hilus.

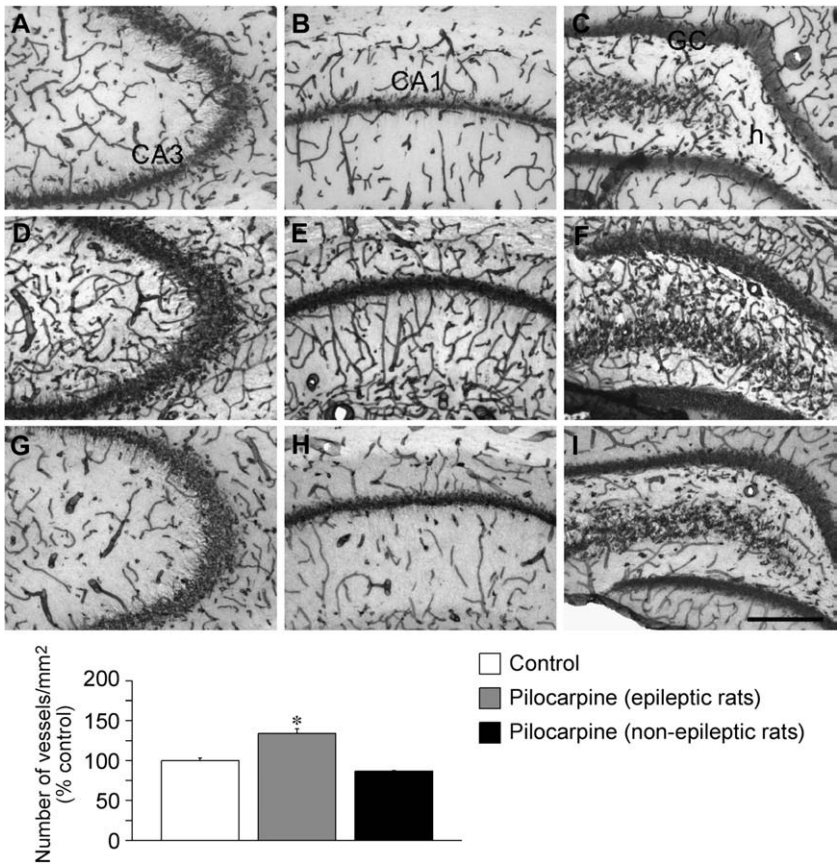


Fig. 6. Microvessels density in the rat hippocampus, 4 months after status epilepticus induced in PN21 rats. Representative micrographs of laminin immunostaining depicting the vascular network in the hippocampus of control (A–C; $n=5$) and experimental (D–I; $n=8$) rats. Note the increased vessel density in epileptic rats ($n=5$; D–F *vs* A–C) in the same areas showing increased IL-1β expression (see Fig. 2G) and BBB damage (see Fig. 4G). In non-epileptic rats ($n=3$) the number of vessels was similar to control rats (G–I *vs* A–C). These rats did not show either IL-1β induction (see Fig. 2H) or BBB damage (see Fig. 4H). Bargram shows (mean ± SE, $n=3$–5) the quantification of the density of microvessels in the hippocampus ($p<0.05$ vs control by Wilcoxon rank sum test). Scale bar: 100 μm. GC, granule cell layer; CA, pyramidal cell layer; h, hilus.

PN9 rats that do not develop epilepsy, as demonstrated by video-EEG recordings. VEGF was also increased in neurons in PN9 and PN21 rats, thus independently on their propensity to develop epilepsy. This pleiotropic peptide is endowed of neurotrophic and neuroprotective effects as shown for example in cultured hippocampal neurons exposed to glutamate or NMDA (see reviews Greenberg and Jin, 2005; Storkebaum et al., 2004); moreover, VEGF protects neurons from SE-induced neuronal cell loss upon its intracerebral application

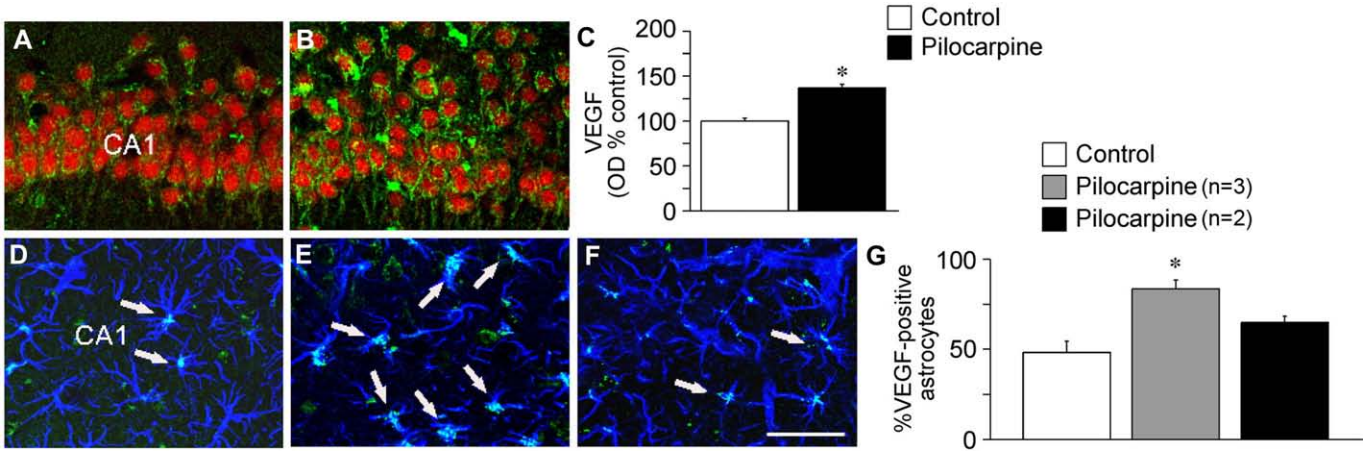


Fig. 7. VEGF expression in the rat hippocampus of PN21 rats, 1 week after status epilepticus. In control hippocampus (A,D; $n=5$), VEGF immunostaining (green signal) was found in neurons (NeuN, red signal in A) and astrocytes (GFAP, blue signal in D). VEGF expression was increased in neurons after status epilepticus in all rats ($n=5$) as compared to controls (B *vs* A). Bargrams in C (mean ± SE, $n=5$) shows the quantification of neuronal VEGF expression; all pilocarpine-treated rats showed similar increases as compared to control rats (*$p<0.05$ *vs* control by Wilcoxon rank sum test), therefore they are represented in a single experimemtal group (black bar). VEGF expression was increased in reactive astrocytes after status epilepticus in 3 out of 5 rats (arrows in E *vs* D) while in the remaining 2 rats VEGF expression did not change (arrows in F *vs* D). Bargram in G (mean ± SE, $n=2$–5) shows the percentage of VEGF-immunopositive astrocytes; only 3 out of 5 rats (gray bar) showed increased astrocytic VEGF ($p<0.05$ *vs* control by Wilcoxon rank sum test) while the remaining 2 rats (black bar) did not show any difference as compared to control rats. Scale bar: 50 μm. CA, pyramidal cell layer.

(Nicoletti et al., 2008). It is therefore conceivable that the increase in VEGF in neurons after SE in PN9 and PN21 rats has a neuroprotective function.

We invariably found leaky vessels in the regions of angiogenesis suggesting that the newly formed vessels do not express a mature BBB. Indeed, the chronic exposure of the retina to VEGF, leads to robust neovascularization, but vessels are leaky and growing in abnormal patterns, thus resulting in severe damage to the tissue (Alon et al., 1995). In PN21 rats exposed to SE, the IgGs that extravasate in the brain parenchyma due to BBB damage, were taken up by neurons displaying eosinophilic cytoplasm, similarly to what described in adult rats (Rigau et al., 2007), suggesting that BBB damage may compromise neuronal survival. Although increased vessel density may compensate for the elevated metabolic request of neurons during seizures leading to increased cerebral blood flow (Fabene et al., 2003; Pereira de Vasconcelos et al., 2002; Rigau et al., 2007) and delivery of oxygen and nutrients to the tissue, the strict association between angiogenesis and BBB damage in our study would instead support detrimental consequences for the tissue.

We did not evaluate if the frequency of spontaneous seizures in chronic epileptic rats has an impact on the extent of the three events analyzed since this study would require a larger group of epileptic rats. Moreover, the extent of inflammation (Ravizza et al., 2006a), angiogenesis (Rigau et al., 2007) and BBB damage (van Vliet et al., 2007) has been previously shown to correlate positively with the frequency of seizures in TLE patients (Ravizza et al., 2006a; Rigau et al., 2007) or in chronic epileptic rats (van Vliet et al., 2007).

Our findings indicate that chronic inflammation and microvasculature alterations occurring during epileptogenesis in PN21 rats are not a mere epiphenomenon of the preceding prolonged seizures since they occur only in a fraction of rats in spite of similar experience of status epilepticus. Previous studies suggest that these phenomena may induce enduring alterations in neuronal network excitability. Elevated brain levels of IL-1β increase seizure susceptibility both in mature and immature rodents (Dubé et al., 2005; Heida and Pittman, 2005; Vezzani et al., 1999, 2000) and blockade of IL-1β synthesis reduces seizures (Ravizza et al., 2006b) and arrests kindling epileptogenesis (Ravizza et al., 2008b). Chronic exposure of brain tissue to elevated IL-1β levels increases glutamate-mediated neuronal cell death (Allan et al., 2005; Bernardino et al., 2005; Viviani et al., 2003). These effects are likely to be caused by IL-1β-mediated inhibition of astrocytic glutamate uptake (Hu et al., 2000; Ye and Sontheimer, 1996) and enhanced glutamate release by astrocytes (Bezzi et al., 2001; Casamenti et al., 1999). Moreover, IL-1β increases NMDA-mediated intracellular Ca^{2+} influx into neurons *via* tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit (Viviani et al., 2003) and inhibits GABA-mediated Cl^- currents (Wang et al., 2000; Zeise et al., 1997). A compromission of the BBB, possibly caused by inflammation, may also contribute to increase neuronal excitability. Thus, the extravasation of blood albumin into the brain parenchyma leads to hypersynchronous propagating epileptic activity that persists even after the BBB permeability function has been restored (Seiffert et al., 2004). The mechanism underlying this process involves downregulation of astrocytic K^+ currents due to albumin uptake via TGF-β receptors (Ivens et al., 2007). Finally, seizures are the most common complication occurring in up to 50% of patients that undergo therapeutic osmotic BBB opening for the treatment of brain tumors (Marchi et al., 2007b; Neuwelt et al., 1986). Although inflammation may play a prominent role in altering the BBB function, other mechanisms should also be taken into consideration such as increase in blood pressure associated with seizures, the production of free-radicals (see review Oby and Janigro, 2006) or glutamate-mediated decrease in occluding levels in endothelial cells (Andras et al., 2007).

In summary, this observational study shows the concomitance of three events, namely inflammation, angiogenesis and BBB breakdown, in the hippocampus of rats prone to develop epileptogenesis, while the same phenomena were absent in rats subjected to SE but not developing epilepsy. Since inflammation and microvasculature changes are described in chronic epilepsy and can contribute to neuronal network excitability and cell death, our data suggest these phenomena are implicated in the mechanisms leading to the onset of spontaneous seizures.

Our findings highlight the need of further investigations to monitor inflammatory and microvascular changes during epileptogenesis using a longitudinal MRI study together with pharmacological attempts to block each one of these alterations to evaluate their impact on the development of epilepsy. This knowledge may allow to develop new approaches with antiepileptogenic potential and/or to determine biomarkers for predicting the development of epilepsy after an injurious precipitating event.

Acknowledgments

This study was supported by Dana Foundation, Fondazione Monzino, Negri Weizmann Programme (A.V.); French Foundation for Research on Epilepsy, Foundation Planiol for Research on Human Neuro-Vascular Pathologies (M.L-N).

References

Abbott, J.N., 2000. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. Cell. Mol. Neurobiol. 20, 131–147.
Allan, S.M., et al., 2005. Interleukin-1 and neuronal injury. Nat. Rev., Immunol. 5, 629–640.
Alon, T., et al., 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. Nat. Med. 1, 1024–1028.
Andras, I.E., et al., 2007. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. J. Cereb. Blood Flow Metab. 27, 1431–1443.
Anthony, D.C., et al., 1997. Age-related effects of interleukin-1 beta on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats. Brain 120 (Pt 3), 435–444.
Argaw, A.T., et al., 2006. IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia–angiogenesis program. J. Immunol. 177, 5574–5584.
Auvin, S., et al., 2007. Inflammation exacerbates seizure-induced injury in the immature brain. Epilepsia 48 (suppl. 5), 27–34.
Ballabh, P., et al., 2005. Development of tight junction molecules in blood vessels of germinal matrix, cerebral cortex, and white matter. Pediatr. Res. 58, 791–798.
Bendfeldt, K., et al., 2007. Basic fibroblast growth factor modulates density of blood vessels and preserves tight junctions in organotypic cortical cultures of mice: a new in vitro model of the blood-brain barrier. J. Neurosci. 27, 3260–3267.
Bernardino, L., et al., 2005. Modulator effects of interleukin 1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. J. Neurosci. 25, 6734–6744.
Bezzi, P., et al., 2001. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. Nat. Neurosci. 4, 702–710.
Carmeliet, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature 438, 932–936.
Carmeliet, P., Tessier-Lavigne, M., 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. Nature 436, 193–200.
Casamenti, F., et al., 1999. Interleukin-1beta activates forebrain glial cells and increases nitric oxide production and cortical glutamate and GABA release in vivo: implications for Alzheimer's disease. Neuroscience 91, 831–842.
De Simoni, M.G., et al., 2000. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. Eur. J. Neurosci. 12, 2623–2633.
de Vries, H.E., et al., 1996. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. J. Neuroimmunol. 64, 37–43.
Del Maschio, A., et al., 1996. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. J. Cell Biol. 135, 497–510.
Dinarello, C.A., 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 87, 2095–2147.
Dubé, C., et al., 1998. C-Fos, Jun D and HSP72 immunoreactivity, and neuronal injury following lithium-pilocarpine induced status epilepticus in immature and adult rats. Brain Res. Mol. Brain Res. 63, 139–154.
Dubé, C., et al., 2005. Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. Ann. Neurol. 57, 152–155.
Fabene, P.F., et al., 2003. Magnetic resonance imaging of changes elicited by status epilepticus in the rat brain: diffusion-weighted and T2-weighted images, regional blood volume maps, and direct correlation with tissue and cell damage. NeuroImage 18, 375–389.
Giulian, D., et al., 1988. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. J. Neurosci. 8, 2485–2490.
Greenberg, D.A., Jin, K., 2005. From angiogenesis to neuropathology. Nature 438, 954–959.

Hallmann, R., et al., 2005. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. Physiol. Rev. 85, 979–1000.
Heida, J.G., Pittman, Q.J., 2005. Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat. Epilepsia 46, 1906–1913.
Hellsten, J., et al., 2005. Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. Biol. Psychiatry 58, 871–878.
Hirsch, E., et al., 1992. Ontogenic study of lithium–pilocarpine-induced status epilepticus in rats. Brain Res. 583, 120–126.
Hu, S., et al., 2000. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. Neuroimmunomodulation 7, 153–159.
Ivens, S., et al., 2007. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. Brain 130, 535–547.
Kubova, H., et al., 2004. Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. Eur. J. Neurosci. 19, 3255–3265.
Marchi, N., et al., 2006. Determinants of drug brain uptake in a rat model of seizure-associated malformations of cortical development. Neurobiol. Dis. 24, 429–442.
Marchi, N., et al., 2007a. In vivo and in vitro effects of pilocarpine: relevance to ictogenesis. Epilepsia 48, 1934–1946.
Marchi, N., et al., 2007b. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. Epilepsia 48, 732–742.
Morgan, J.I., Curran, T., 1991. Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. Trends Neurosci. 12, 459–462.
Nagy, J.A., et al., 2008. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. Angiogenesis 11, 109–119.
Naldini, A., Carraro, F., 2005. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy 4, 3–8.
Neuwelt, E.A., et al., 1986. Therapeutic efficacy of multiagent chemotherapy with drug delivery enhancement by blood-brain barrier modification in glioblastoma. Neurosurgery 19, 573–582.
Nicoletti, J.N., et al., 2008. Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus. Neuroscience 151, 232–241.
Noé, F., et al., 2008. Neuropeptide Y gene therapy decreases chronic spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. Brain 131, 1506–1515.
Oby, E., Janigro, D., 2006. The blood-brain barrier and epilepsy. Epilepsia 47, 1761–1774.
Paxinos, G., Watson, C., 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York.
Pereira de Vasconcelos, A., et al., 2002. Local cerebral blood flow during lithium–pilocarpine seizures in the developing and adult rat: role of coupling between blood flow and metabolism in the genesis of neuronal damage. J. Cereb. Blood Flow Metab. 22, 196–205.
Priel, M.R., et al., 1996. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. Epilepsy Res. 26, 115–121.
Racine, R.J., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 32, 281–294.
Ravizza, et al., 2006a. The IL-1β system in epilepsy-associated malformations of cortical development. Neurobiol. Dis. 24, 128–143.
Ravizza, T., et al., 2006b. Inactivation of caspase-1 in rodent brain: a novel anticonvulsive strategy. Epilepsia 47, 1160–1168.
Ravizza, T., et al., 2008a. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. Neurobiol. Dis. 29, 142–160.
Ravizza, T., et al., 2008b. Interleukin converting enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL-1beta production. Neurobiol. Dis. 31, 327–333.
Rigau, V., et al., 2007. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. Brain 130, 1942–1956.
Rizzi, M., et al., 2003. Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development. Neurobiol. Dis. 14, 494–503.
Roch, C., et al., 2002. Predictive value of cortical injury for the development of temporal lobe epilepsy in 21-day-old rats: an MRI approach using the lithium–pilocarpine model. Epilpesia 43, 1129–1136.
Sankar, R., et al., 1998. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. J. Neurosci. 18, 8382–8393.
Scantlebury, M.H., et al., 2007. Age-dependent consequences of status epilepticus: animal models. Epilepsia 48 (Suppl. 2), 75–82.
Schmitz, C., Hof, P.R., 2005. Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience 130, 813–831.
Schulze, C., Firth, J.A., 1992. Interendothelial junctions during blood-brain barrier development in the rat: morphological changes at the level of individual tight junctional contacts. Brain Res. Dev. 69, 85–95.
Seiffert, E., et al., 2004. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. J. Neurosci. 24, 7829–7836.
Storkebaum, E., et al., 2004. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. Bioessays 26, 943–954.
van Vliet, E.A., et al., 2007. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. Brain 130, 521–534.
Vezzani, A., Baram, T.Z., 2007. New roles for interleukin-1beta in the mechanism of epilepsy. Epilepsy Curr. 7, 45–50.
Vezzani, A., Granata, T., 2005. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. Epilepsia 46, 1724–1743.
Vezzani, A., et al., 1999. 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, 5054–5065.
Vezzani, A., et al., 2000. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 11534–11539.
Viviani, B., et al., 2003. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. J. Neurosci. 23, 8692–8700.
Wang, S., et al., 2000. Interleukin-1beta inhibits gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons. J. Pharmacol. Exp. Ther. 292, 497–504.
Ye, Z.C., Sontheimer, H., 1996. Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. NeuroReport 7, 2181–2185.
Zeise, M.L., et al., 1997. Interleukin-1beta does not increase synaptic inhibition in hippocampal CA3 pyramidal and dentate gyrus granule cells of the rat in vitro. Brain Res. 768, 341–344.

ARTICLE 3

VEGF is a pivotal factor in angiogenesis and blood-brain barrier permeability associated with focal epilepsy

Mélanie Morin, Aurore Lebrun, Marie-Claude Rousset, Laurent Fagni
Joël Bockaert, Frédéric de Bock, Mireille Lerner-Natoli

VEGF is a pivotal factor in angiogenesis and blood-brain barrier permeability associated with focal epilepsy

Mélanie Morin[1], Aurore Lebrun[1], Marie-Claude Rousset[1], Laurent Fagni[1], Joël Bockaert[1], Frédéric de Bock[1], Mireille Lerner-Natoli[1]

[1] CNRS UMR5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France, INSERM U661, Université Montpellier 1, 2

Address correspondence to: Mireille Lerner-Natoli, CNRS UMR5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France, INSERM U661, Université Montpellier 1, 2, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier, Cedex 5, France.

Phone: 33-4-67-14-29-42 Fax: 33-4-67-54-24-32 Mail: mireille.lerner-natoli@igf.cnrs.fr

Nonstandard abbreviations used; BBB, blood-brain barrier; IB4, isolectin B4; OHC, organotypic hippocampal culture; LDH, lactate dehydrogenase ; PI, propidium iodide; PS, post-seizure; PTZ, pentylenetetrazol; SE, status epilepticus; TLE, temporal lobe epilepsy; ZO-1, zonula occludens 1.

ABSTRACT

The pathogenesis of temporal lobe epilepsy (TLE), a common, often drug-refractory form of focal epilepsy, is not fully understood. Morphological analysis of the epileptic focus suggests that tissue remodelling participates in epileptogenesis. In chronic TLE, we described previously angiogenic processes and a severe disruption of the blood-brain barrier (BBB), which is known to contribute directly to seizure induction.

We aimed at investigating the role of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in BBB permeability, using *in vivo* and *in vitro* rat models of seizures.

After *in vivo* seizures, we observed an up-regulation of VEGF in neurons and astrocytes and of its receptor VEGFR-2 in endothelial cells, preceding BBB disruption and neovascularisation. However, these changes were persistent in a model of chronic epilepsy and transient in kindling, a model of hyper-excitability without spontaneous seizures. *In vitro*, seizure induction in hippocampal organotypic cultures was followed by over-expression and secretion of VEGF, degradation of tight junctions and neovascularisation. We showed that VEGF neutralization by a monoclonal antibody after seizures prevented neovascularisation and repaired the tight junctions.

Together, these results demonstrate the crucial role of VEGF in BBB permeability associated with focal epilepsy and suggest that BBB protection with anti-angiogenic compounds could reduce epileptogenesis.

INTRODUCTION

Temporal Lobe Epilepsy (TLE) is the most common and severe form of symptomatic focal epilepsies. For up to one-third of patients, seizures become refractory to anti-epileptic drugs, the surgical ablation of the focus being the only therapeutic issue (1). The pathogenesis of intractable TLE is not fully understood, but brain imaging and neuropathological observations suggest that progressive cellular and molecular reorganization, including neuronal death, gliosis, inflammation, neurogenesis and synaptic plasticity is activated by seizures and participates in chronic epileptogenesis (2). Nowadays, a growing body of evidence suggests that a failure of blood-brain barrier (BBB) also directly contributes to ictogenesis and/or epileptogenesis. Indeed, the extravasation of blood cells and proteins has severe consequences, which have been previously reported in human or animal epileptic foci: leucocytes promote inflammatory and immune responses, whereas serum proteins that accumulate in the parenchyma induce osmotic unbalance, oedema, interictal hypoperfusion and hyper-excitability (3-12). Recently, our group described a pathological angiogenesis associated with a leaky BBB in the hippocampus of patients suffering from chronic intractable TLE (13). This aberrant vascular remodelling is a common morphological substrate for all forms of drug-refractory TLE, whatever the age of patients, the aetiology and the duration of epilepsy or the extent of damages, but is positively correlated with seizure frequency. Interestingly, we observed that the vascular endothelial growth factor (VEGF) is persistently over-expressed by neurons and to some extent by astrocytes of the chronic focus. Other studies in animal relevant models confirmed that after seizures, VEGF is rapidly induced in neurons, then in astrocytes and is still over-expressed in chronic epilepsy (13-16).

VEGF is a pleiotropic growth factor, known to be induced in response to hypoxia and inflammation. The receptor VEGFR-2 (flk1) expressed by immature endothelial cells can also be induced in various types of cells, including neurons. VEGFR-2 activates numerous

signalling pathways (17). Obviously, some pathways are in principle neuroprotective or improve perfusion during seizures (18). Nevertheless VEGFR-2 activation can be deleterious, in particular for the BBB, through degradation of the extracellular matrix of basement membrane or internalization and proteolysis of tight junction proteins (19, 20). We hypothesized that angiogenesis and epileptogenesis form a vicious circle: recurrent seizures trigger VEGF release and VEGFR-2 activation, which disrupt the BBB, allowing leakage of blood cells and proteins. In turn, the resulting changes in neuronal environment create epileptogenic conditions.

A link between VEGF secretion and BBB breakdown has never been proven in epilepsy. The present study was designed to examine whether: i) seizure-induced VEGF release promotes aberrant angiogenesis and BBB permeability; ii) blocking VEGF/VEGFR-2 activation after seizures prevents this vascular reorganization.

We attempted to correlate the BBB permeability with the occurrence of spontaneous seizures by comparing a model of chronic limbic epilepsy secondary to status epilepticus (SE) (21) and kindling, a model of synaptic plasticity and hyperexcitability (22). To investigate the role of VEGF in angiogenic processes and BBB disruption observed in the epileptic focus, we developed an integrative *in vitro* model of neuro-angiogenesis secondary to seizures. It has been reported that organotypic cortical cultures maintain microvessels and BBB tight junctions, even in the absence of blood flow, and that capillary density is modulated by environmental factors (23, 24). We found that this could also apply to organotypic hippocampal cultures (OHC). Indeed, seizure induction, secondary neuronal death, inflammation and reactive plasticity were already described in OHCs (25-28). We compared the effects of seizures, with and without secondary damage, on the kinetics of angiogenesis and on tight junction integrity. We investigated the anti-angiogenic effects of a neutralizing monoclonal antibody raised against rat VEGF. This compound is equivalent to the anti-human

VEGF antibody (*bevacizumab*), an effective anti-angiogenic in colorectal cancer, gliomas and age-related macular degeneration (29-33).

In vivo, we observed that angiogenesis is transient in the kindling model and persistent in the model of chronic epilepsy. *In vitro*, we confirmed that VEGF is released by neurons and astrocytes after seizures, and demonstrated that its specific inhibition successfully protects the vascular integrity. Taken together these data suggest that VEGF is the main actor in blood-brain barrier damage induced by seizures.

RESULTS

1- Angiogenesis and BBB disruption are persistent in the pilocarpine model of chronic epilepsy

Lithium-pilocarpine treatment induced an acute status epilepticus characterized by continuous seizures, alternatively partial and generalized, that persisted for several hours, assessed by EEG recording. During the following 2-3 weeks no behavioural epileptic activities were detected (silent period). Then, all the animals displayed spontaneous recurrent short hippocampal seizures, corresponding to the chronic phase of epilepsy (Figure 1, A).

Vascular density was assessed by DAB staining as previously described (13). Rats that experimented SE displayed a progressive remodelling of their vascularisation during silent and chronic periods compared to age-matched, sham-injected animals, which showed an unmodified vascularisation at each time-point. In the acute period, the vascular density was not modified, but some microvessels appeared dilated, which was consistent with increase of local blood flow during seizures reported in this model (34). In the silent and chronic periods, microvessels appeared more numerous in all hippocampal areas (Figure 1, B, C, D and E). The point-counting method revealed a significant increase of vascular density in silent (≈ +60%) and chronic (≈ +80%) phases (Figure 1, F).

We then searched for factors responsible for the observed neovascularisation. We studied the expression of VEGF by immunohistochemistry and Western blot. In control animals, we observed an important basal expression of VEGF likely stored in large vesicles in neurons but not in astrocytes (Figure 1, G). In the acute phase VEGF was strongly and rapidly over-expressed by neurons (Figure 1, H). During silent and chronic phases, the neuronal expression of VEGF remained higher than control value, and VEGF was also obviously stored in vesicles of hypertrophic astrocytes (Figure 1, I and J). Immunoblotting corroborated the above

immunohistochemical observations with significant increases of VEGF levels in the 3 phases (≈ +50% ≈ +80% and ≈ +100%, respectively) (Figure 1, K).

Then, we investigated the expression of VEGFR-2, the main VEGF receptor. In control rats VEGFR-2 was not obvious in microvessels but was substantially expressed in neurons (Figure 1, L). During epileptogenesis, VEGFR-2 staining slightly increased in neurons, whereas VEGFR-2 was transiently expressed in endothelial cells of capillaries during acute and silent periods and decreased in the chronic phase (Figure 1, M, N and O). Western blots confirmed that the enhancement of VEGFR-2 expression was significant during both acute and silent periods (≈ +80 and +100%, respectively) (Figure 1, P).

The integrity of the BBB was evaluated by monitoring the expression and localisation of zonula occludens 1 (ZO-1), a crucial scaffold protein of tight junctions (35, 36). A regular staining of ZO-1 was obvious along the capillaries in the whole hippocampus of control rats (Figure 1, Q). However, in acute, silent and chronic phases of epileptogenesis, ZO-1 staining was discontinuous, indicating a BBB disruption (Figure 1, R, S and T). Western blot analysis showed a significant decrease of ZO-1 expression in acute and chronic phases (≈ -35% and -50%, respectively) (Figure 1, U).

2- Angiogenesis and BBB disruption are transient in the kindling model

In the kindling model, the first pentylenetetrazol (PTZ) injections generated stage 1 seizures characterized by short EEG discharges (1 to 5 s) in the hippocampus, thalamus and cortex, concomitant to behavioural score 1. Subsequent injections induced a progressive aggravation of the EEG discharges (≈1 min at score 5) and of behavioural seizures. We pooled groups of animals displaying similar clinical manifestations: scores 2 and 3 (body jerks) and scores 4 and 5 (clonic convulsions) (Figure 2, A).

Vascular density was evaluated in the whole hippocampus 24 hours post-seizures (PS) at different kindling scores and compared with values of age-matched, sham-injected animal. The vascular density did not change with age in control animals. It was significantly increased during kindling at score 1 (+10%) and score 2/3 (+25%), and then stabilized overtime (Figure 2, B, C, D, E and F).

Kindled-rats at score 1 showed a strong over-expression of VEGF in both neurons and astrocytes as compared to control rats (Figure 2, G and H). At higher scores, VEGF staining decreased in both cell types (Figure 2, I and J). Western blot quantification confirmed an important peak of VEGF at score 1 (≈ +170%), followed by a strong decrease at scores 2-3, then a slight rebound at scores 4-5 (Figure 2, K).

In control animals, VEGFR-2 was faintly expressed in neurons and lacking in endothelial cells (Figure 2, L). From score 1 to score 5 the receptor was over-expressed in neurons, whereas it was transiently expressed in endothelial cells of capillary tips at score 1 (Figure 2, M, N and O). Western blot analysis revealed a significant over-expression of VEGFR-2 all along kindling development (≈ +40%, +80%, +50% respectively) (Figure 2, P).

Control rats showed a regular ZO-1 staining along microvessels (Figure 2, Q). During kindling development ZO-1 staining was continuous in score 1, likely disrupted in scores 2-3 and continuous and regular at stages 4-5 (Figure 2, R, S and T). Nevertheless, immunoblotting quantification indicated that these changes were not significant (Figure 2, U).

3- *In vitro* seizures induce angiogenesis and blood-brain barrier disruption

In the first model, OHCs were perfused with 25 µM kainate for 1 h, generating 2 to 3 successive seizures, lasting approximately 15 s, at a frequency of 8 Hz (Figure 3, A). Propidium iodide (PI) accumulation showed a selective damage in the CA3 hippocampal area, as previously described by de Bock et al. (37) (Figure 3, E). The activity of lactate

dehydrogenase (LDH) in the medium was significantly increased compared to control slices (15% cytotoxicity, Figure 3, G).

In a second model, OHCs were perfused for 15 min with 10 µM bicuculline, which triggered numerous short lasting seizures (10 s), at a frequency of 5-6 Hz, occurring regularly each 30 s, and lasted for 1 h after removal of bicuculline (Figure 3, B). We observed a very low PI accumulation and LDH activity (1.5% cytotoxicity) similar to that of control slices (Figure 3, F and G).

We used both *in vitro* models to investigate putative vascular remodelling and angiogenic processes in response to seizures with or without neuronal damage, according to the experimental design shown on Figure 3, H.

Firstly we investigated possible neo-vascularisation in both models. Using the same quantification method as for *in vivo* models, we observed an increase of vascular density induced by either kainate or bicuculline that was significant 24 h PS (≈ +20% in both models, Figure 4, A and B). In control OHCs, immunohistochemistry revealed large microvessels which derived from the peri-ventricular zone and the fissura hippocampi, with collaterals forming a regular network of capillaries in the whole hippocampus (Figure 4, C, D, E and F). In both models of seizures, the vascular density increased in all areas, with a large number of tortuous capillaries and intense branching (Figure 4, G, H, I, J, K, L, M and N). We also evaluated the BBB integrity by measuring expression of three tight junction proteins: occludin, claudin-5 and ZO-1. In both models, Western blot showed a rapid and significant decreased of occludin expression only 4 h PS (≈ -50% in kainate, ≈ -60% in bicuculline), which then returned to control level (Figure 4, O and R). Similarly we observed a decrease of claudin-5 in kainate and bicuculline models 4 h PS (≈ -40% in kainate, -50% in bicuculline). Twenty-four hours post-seizures, claudin-5 expression was similar to control condition (Figure 4, P and S). In the kainate model, immunoblotting revealed a significant, rapid and

persistent degradation of ZO-1 (≈ -55% 4 h PS and 24 h PS) (Figure 4, Q). In contrast, in the bicuculline model ZO-1 expression decreased faintly at 4 h PS only (≈ -30%), then returned to control levels. (Figure 4, T)**.** Since ZO-1 has a crucial role in tight junction assembly (35), we evaluated tight junction integrity by ZO-1 immunostaining. In control OHCs, we found a regular ZO-1 staining along microvessels. In both seizure models, ZO-1 labelling was discontinuous or absent at 4 h PS (Figure 4, U, V and W). This degradation persisted for 24 h in the kainate model, whereas ZO-1 expression and localisation appeared normal at this time-point in the bicuculline model (Figure 4, X, Y and Z). At later time-points (48 h PS) the vascular density and blood-brain barrier integrity were comparable to those observed at 24 h in both models. For these reasons, further studies on angiogenic processes were exclusively carried out between 1 and 24 h after seizures.

5- VEGF is up-regulated and secreted by neurons and astrocytes after *in vitro* seizures

To investigate angiogenic processes *in vitro* we studied VEGF expression, secretion and cellular localisation in OHCs. Using quantitative RT-PCR, we observed that VEGF mRNAs were significantly up-regulated in the kainate model at 4 and 24 h after seizures (1.7 and 1.4 fold increase respectively), whereas in the bicuculline model, VEGF mRNAs increased significantly at 1 h, 4 h and 24 h post-seizures (1.9, 1.9 and 1.7 fold increase, respectively). In both models, there was a significant down-regulation of VEGF at 14 h (Figure 5, A and B). Protein expression showed a single significant increase at 14 h (≈ +70% for kainate model and +50% for bicuculline model) (Figure 5, C and D). We also measured the level of VEGF that accumulated in culture medium after seizures by ELISA. In both models, VEGF accumulation was significantly enhanced at 24 h PS. VEGF secretion was 1,700 pg/ml in control OHCs, 2,060 pg/ml in kainate-treated OHCs (≈ +35%) and 1,950 pg/ml in bicuculline-treated OHCs (≈ +20%) (Figure 5, E and F). To identify the cell types that expressed VEGF, we used

immunofluorescence at 14 h PS, a time-point which corresponds to the peak of VEGF expression shown by Western blot. In control OHCs the basal expression of VEGF was rather low in neurons and astrocytes (Figure 4, G and J), while a strong VEGF staining was clearly observed in neurons and astrocytes in both seizure models (Figure 5, H and I). Moreover, at higher magnification we could observe the diffusion of VEGF around the microvessels (Figure 5, K and L).

6- VEGFR-2 is over expressed after *in vitro* seizures

As for *in vivo* experiments, we studied the expression of the receptor VEGFR-2 and its cellular localisation. In the kainate model, quantitative RT-PCR revealed a significant up-regulation of VEGFR-2 mRNAs 4 h PS (≈ 1.4 fold increase) (Figure 6, A). In the bicuculline model, we noted a rapid, significant increase of mRNAs at 2, 4 and 24 h PS (2, 2 and 1.8 fold increase, respectively) (Figure 6, B). In both models there was a strong decrease at 14 h (Figure 6, A and B) concomitant with a significant increase of the protein. These changes were greater in the bicuculline model than in the kainate model (≈ +20% to +40%). It is noteworthy that VEGFR-2 over-expression persisted at 14 h in kainate model whereas it was transient in bicuculline model (Figure 6, C and D). The cellular localisation of VEGFR-2 protein was assessed by immunofluorescence at 14 h after seizures. In control conditions, we observed a very low staining of VEGFR-2 in neurons and blood vessels (Figure 6, E, H and K). In the kainate and bicuculline models, immunostaining revealed a strong VEGFR-2 expression in neurons and vascular cells (Figure 6, F, G, I, J, L and M).

7- VEGF is the main actor of seizure-induced angiogenesis and BBB breakdown

To confirm the involvement of VEGF in seizure-induced vascular alterations, we blocked its activity with an anti-VEGF antibody. We chose to neutralize VEGF at 4 h after seizures, a

time-point which corresponds to the beginning of angiogenic processes, evaluated by the loss of tight junction proteins and the up-regulation of VEGF (Figure 7, A). First, we confirmed that the antibody neutralized the secreted VEGF in both models, by measuring VEGF concentration in culture medium at 24 h PS, *i.e.* the time-point of maximal VEGF accumulation. In the presence of the antibody, VEGF concentration could not be detected, indicating a successful neutralization (Figure 7, B and C). Then we checked the vascularisation 24 h after treatment. We observed no effect of the antibody on vascular network in control conditions (Figure 7, D and G), whereas in both models of seizures, OHCs treated with the antibody showed a vascularisation similar to control OHCs. Indeed, the vascular remodelling with capillary sprouting and branching observed after seizures was lacking in the presence of the anti-VEGF antibody (Figure 7, E, F, H and I). The quantification of vascular density confirmed that the antibody significantly inhibited the neo-vascularisation secondary to seizures in both models (Figure 7, J and K).

Then we investigated the involvement of VEGF/VEGFR-2 in BBB permeability. BBB integrity was evaluated 24 h after seizures. Treatment with the anti-VEGF antibody did not modify the tight junctions in control OHCs, since ZO-1 staining was similar with or without the antibody (Figure 7, L and O). In the kainate model, the regular staining of ZO-1, absent at 4 h PS, was rebuilt 20 h after the treatment with the neutralizing antibody (Figure 7, M and P). However, in the bicuculline model we observed a regular ZO-1 staining in the presence or absence of antibody, since at this time-point the BBB was self-repaired (Figure 7, N and Q). Immunoblotting confirmed that 24 h after kainate-induced seizures, the antibody treatment counterbalanced the loss of ZO-1, while in the bicuculline model ZO-1 expression was unchanged in absence of antibody (Figure 7, R and S).

DISCUSSION

In the present study we demonstrated that seizure-induced VEGF/VEGFR-2 activation is responsible for BBB permeability observed in epileptic focus and that neutralizing VEGF significantly protected the tight junctions.

A few hours after seizures VEGF was up-regulated in both neurons and astrocytes, as previously described in different *in vivo* models (13, 14, 38). VEGF is known to be induced in hypoxic or inflammatory conditions by different transcription factors: HIF-1, AP-1, Sp-1, STAT 3 (39, 40). An increased activity of these factors after *in vivo* experimental seizures was previously reported (41-44). However, a consistent basal store of VEGF can be rapidly released from neurons by the shedding of the large extracellular vesicles (45). We showed that VEGFR-2 was also up-regulated in neurons and endothelial cells after seizures. Like other autocrine/paracrine growth factors, VEGF provides neuroprotection by activating the Akt/PI3K survival pathway in neurons (16). Moreover, VEGF decreases synaptic transmission and reduces spontaneous discharges in epileptic tissue, although the pathways involved are not identified (46). In endothelial cells, VEGFR-2 activates different angiogenic pathways: inositol tri-phosphate and eNOS promote vasopermeability, PLCγ and P42/44 MAPK induce cell proliferation whereas Src, PI3K and p38 MAPK stimulate cell migration and the loss of adherens junctions (47, 48). It is noteworthy that eNOS is also involved in an immediate neurovascular coupling which is crucial to adapt the local blood flow to the intense neuronal activity during seizures (49). At the tight junctions, VEGF is detrimental via PKC-dependent phosphorylation and internalisation of occludin, (36) and PLC-activated matrix metalloproteases which degrade claudin-5 and occludin (50), leading to an increase of paracellular flux. Such an effect of VEGF on tight junction proteins was suggested in stroke and neuro-inflammatory pathologies, particularly Alzheimer's disease, but was never demonstrated in epilepsy (51, 52).

In the present study, we showed that VEGF and VEGFR-2 are differently regulated in *in vivo* models. In the pilocarpine model, VEGF is regularly increased throughout epileptogenesis, mainly in neurons and later in astrocytes, while VEGFR-2 is over-expressed in endothelial cells during acute and silent period. As a consequence, the BBB is permanently open, as shown by the loss of ZO-1 in tight junctions. In the kindling model, VEGF is strongly up-regulated at stage 1 only, while VEGFR-2 is always over-expressed, mainly in neurons. Moreover the BBB is progressively repaired, despite the increasing duration and severity of kindling seizures, evoking a vascular ischemic tolerance similar to that described by Kunz et al. (53). It is notable that the pilocarpine model generates chronic epilepsy with spontaneous, recurrent seizures, whereas kindling is a model of hyperexcitability without spontaneous seizures. These discrepancies between the two models strengthen the hypothesis that BBB permeability sustains chronic epilepsy.

Using *in vitro* models of seizures, with or without secondary damage, we observed in 24 h the same vascular changes as *in vivo*. Both models induced a significant increase of vascular density, but we noted differences in BBB permeability. Like the *in vivo* pilocarpine model, kainate induced seizures, neuronal loss, gliosis and a persistent degradation of tight junctions, whereas bicuculline generated seizures without damage and a transient BBB disruption, as we observed during kindling. In both models, the decrease of occludin and claudin-5 expression was progressively reversed. These transmembrane proteins are involved in electrical resistance of endothelial cells and in regulation of tight junctions in response to environmental changes, respectively. In contrast, the loss of ZO-1 was transient in the bicuculline model and persistent in the kainate model. It is interesting to notice that ZO-1 is a cytoplasmic protein, essential for tight junction assembly, by anchoring the transmembrane proteins to actin via its PDZ domains (19). Therefore, even if occludin and claudin-5 expression returned to control levels, the lack of ZO-1 expression at the tight junction meant that the BBB was permeable.

Importantly, neutralizing VEGF after *in vitro* seizures prevents the neo-vascularisation of OHCs and increases ZO-1 expression, leading to the reassembling of tight junctions.

In conclusion, our findings reveal VEGF as a pivotal factor in pathological angiogenesis and BBB permeability associated with chronic focal epilepsy. Future investigations should target specific VEGFR-2 signalling pathways involved in vasopermeability and tight junction degradation, bearing in mind that protecting BBB integrity could reduce epileptogenicity.

METHODS

All animal procedures were conducted in accordance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and approved by the French Ministry of Agriculture (authorization no. 34178, M.L-N).

In vivo models of epileptogenesis

Surgery: 80 male Sprague–Dawley rats (Janvier), weighing 200–250 g, were anaesthetized with 3 ml/kg of Equithesin (i.p.) and stereotaxically implanted with a deep bipolar electrode in the right hippocampus or the right thalamus, plus extradural screws.

Li-Pilocarpine model (40 rats)

One week post-surgery, all rats were pretreated with lithium (3 meq/kg i.p., Sigma) and, 18 h later, with methylscopolamine bromide (1 mg/kg i.p., Sigma). Then 28 rats received pilocarpine hydrochloride injection (30 mg/kg, i.p., Sigma), whereas 12 sham-injected controls received saline. EEG recording and behavioural observation confirmed that all treated rats underwent SE *i.e.* continuous discharges on the EEG and partial as well generalized seizures. Two hours after SE onset, the severity of convulsions was reduced with 2 mg/kg diazepam i.p. (Roche), but hippocampal discharges persisted on the EEG for several hours concomitant to partial clonic seizures. Then, rats were recorded and observed during the following days and were sacrificed at various time-points: acute period (1 to 24 h after SE onset, n = 7), silent period (assessed by the lack of interictal spikes or spontaneous seizures on EEG at 4 to 14 d after SE, n = 8) and chronic period (with interictal or ictal EEG activity, 21 to 28 d after SE, n = 6). Seven rats died in the first week following SE. As controls, 4 sham-injected rats were sacrificed at each time-point. Rats were killed by decapitation under deep anaesthesia (4 mg/kg diazepam (Roche, i.p.)

Chemical kindling model (40 rats)

One week post-surgery 25 rats were given 30 mg/kg PTZ every second day for 28 days and 15 control rats received the vehicle only. EEG was recorded and behavioural score was evaluated after each injection as follows: score 1, ear and facial twitching; score 2, 1 to 20 myoclonic body jerks in 10 min; score 3, more than 20 body jerks in 10 min; score 4, clonic forelimb convulsions; score 5, generalized clonic convulsions with episodes of rearing and falling down (54). Five rats were decapitated under deep anaesthesia (4 mg/kg diazepam i.p., Roche) 24 h after reaching each stage of kindling. At the same time-points, 3 age-matched, sham-injected animals were also killed.

***In vitro* models of seizures**

Culture techniques

Organotypic Hippocampal cultures (OHCs) were prepared and cultured according to Stoppini et al. (55). Hippocampi of 6-7 day-old Sprague Dawley rats (Janvier) were rapidly dissected under aseptic conditions and transverse section (400 µm) were obtained using a tissue chopper (MacIllwain). Ten slices were placed on a 30 mm porous membrane (Millicell-CM, Millipore) and kept in 100 mm diameter Petri dishes filled with 5 ml of culture medium composed of 25% heat-inactivated horse serum, 25% HBSS, 50% Opti-MEM, penicillin 25 units/ml, streptomycin 25 µg/ml (Gibco). Cultures were maintained in a humidified incubator at 35°C and 5% CO_2. One week later, cultures were transferred in defined medium composed of 25% B27 supplemented Neurobasal medium, 25% HBSS, 50% Opti-MEM, penicillin 25 units/ml, streptomycin 25 µg/ml (Gibco).

Treatments and seizure induction

After 2 weeks, membranes were transferred to 6 well-plates, each well filled with 1 ml defined culture medium. Any compound applied thereafter was added in this volume and below the membrane, in order to obtain the desired final concentration.

To induce seizures, slices were treated with either 25 µM kainate (Sigma) for 1 h (n = 800), or with 10 µM bicuculline (Sigma) for 15 min (n = 1,100) or without treatment for controls (n = 2,000).

In a series of experiments aimed at neutralizing the biological activity of endogenous VEGF secreted in epileptogenic conditions, a monoclonal anti-rat VEGF antibody (R&D systems) was added 4 h after seizures in the culture medium at 1 µg/ml for 24 h (n = 600 with anti-VEGF or 700 without).

At various time-points (1, 2, 4, 14, 24 h) after treatments, slices and culture medium were treated or collected for different analysis.

Electrophysiological recording of seizures

Fifteen slices were transferred from dishes into an interface recording chamber, maintained at 30°C and perfused with non oxygenated defined medium, to mimic culture conditions. Seizures were induced by application of kainate (n = 5) or bicuculline (n = 5) as described above, whereas 5 control slices did not receive any epileptogenic drugs. A glass micropipette filled with culture medium (1-5 mOhms) was positioned into the apical dendritic area of the CA1 pyramidal layer, to record dendritic field potentials. The signal was amplified, filtered (1 Hz - 1 kHz) and digitized at 3 kHz.

Cell death detection

Lactate dehydrogenase test

Twenty-four hours after seizures, 100 µl of culture medium was collected for the measurement of LDH released by damaged cells (56). Cultures treated for 1 h with glutamate (25 mM, n = 35) were used as maximal toxicity controls. To determine LDH activity, 100 µl of reaction mixture (Roche Applied Science) was added to each sample and incubated 30 min at RT protected from light (kainate: n=20, bicuculline: n = 20, control: n=40). Optical density was measured on a microplate reader (wavelength 490 nm).

Propidium iodide staining

PI 7.5 µg/ml (57) was added in the medium immediately after kainate (n = 10), bicuculline (n = 10) or glutamate treatment (n = 20). Control slices (n = 30) received no treatment. After 24 h, the culture medium was changed to eliminate extracellular PI and then slices were fixed with buffered 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C during 30 min and observed on a microscope equipped for epifluorescence (Leica).

Morphological study of vascularisation, VEGF/VEGFR-2 expression and tight junctions

In vivo models

After decapitation, both hemispheres were separated. The left hippocampus was dissected and frozen in liquid nitrogen for Western blot. The right hemisphere was either immersed in buffered 4% PFA and cut with a vibratome in 30 µm sections or frozen in liquid nitrogen and cut with a cryostat in 15 µm sections.

PFA-fixed sections were used to evaluate the vascular density by DAB staining of endogenous peroxidase expressed by red blood cells as previously reported (13) or the expression of VEGF and its receptor in different types of cells by immunohistochemistry. Briefly, slices were incubated overnight at 4°C with combinations of 2 or 3 primary antibodies: anti-VEGF, anti-GFAP, anti-NeuN, anti-VEGFR-2 and isolectin B4 (IB4). Frozen

sections were fixed in methanol and processed for tight junction staining with an anti-ZO-1 antibody and IB4 (see Table 1).

In vitro models

Slices were fixed in 4% PFA for 30 min and stored at 4°C in PBS containing 0.1% $NaNO_3$. To evaluate vascular density and ZO-1 expression, immunohistochemistry was carried out on free-floating whole slices. After pre-incubation in a PBS solution containing 10% goat serum and 0.1% Triton for 2 h at RT, slices were incubated 48 h at 4°C with anti-laminin and anti-ZO-1 antibodies in PBS + 0.1% Triton.

For VEGF and VEGFR-2 expression, fixed slices were cryo-protected by successive sucrose solutions (10, 20 and 30%). Slices were cut into 20 µm sections with a cryostat, mounted on slides and processed for immunostaining as above.

Microscope observation and image acquisition

For vascular density, sections were observed with a Leitz DMRB microscope (Leica, Wetzlar) equipped for fluorescent microscopy. Images were digitized by a 1392x1040 resolution cooled CCD camera (Cool Snap, Princeton Instrument) on a computer with Cool Snap software and transferred to Adobe Photoshop Elements (version 4) for image processing.

For VEGF, VEGFR-2 and ZO-1 immunostaining, sections were observed using a confocal microscope (Zeiss 510 Meta) equipped with an x63 objective (oil, numeric opening 1.4). We used an argon laser (excitation 488, emission 505-530 nm) for Alexa 488, a helium laser (excitation 543, emission 585-615 nm) for Texas Red and a krypton-argon laser (excitation 647nm, emission 660-700nm) for Alexa 647. Images were collected sequentially to avoid cross-contamination between fluorochromes. Series of 15 optical sections were projected onto a single image plane and scanned at 1024 x 1024 pixel resolution.

VEGF and VEGFR-2 transcripts

At different time-points after treatment, slices were placed in RNAlater tissue collection solution (Ambion) for RNA stabilization before extraction (control n = 600, kainate n = 300 and bicuculline n = 300). Total RNAs were prepared using the RNAqueous-4PCR kit (Ambion) and their concentration was evaluated by Nanodrop (Thermo Scientific). Then 300 ng RNAs were reverse-transcribed with Cloned AMV First-Strand cDNA synthesis (Invitrogen). Primer pairs were designed with PrimerExpress (Applied Biosystems): VEGF 5'- TTGAATCCGCATGATCTGCATA-3' and 3'-GCTATTGCCGTCCAATTGAGA-5'; VEGFR-2 5'-CGCTGGAGTACACGGTGGTAT-3' and 3'-TGTCAGAGACACTGAGCATGGA-5' and B-actin 5'-CCAGRGGRACGACCAGAGGC-3' and 3'-CGTAGCCATCCAGGCTGTGT-5'; TATA Box Binding Protein 5'-AATCCAGGAAATAATTCTGGCTCATA-3' and 3'-GTTGACCCACCAGCAGTTCAG-5'; HPRT 5'-TCGCTGATGACACAAACATGATT-3' and 3'TGACTATAATGAGCACTTCAGGGATT-3'.

QPCR was performed using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems 7500). Reverse-transcribed products (10 ng) were amplified in 10 µl of a solution containing 1X Syber Mix and primers.

β-actin, TATA box binding protein and HPRT were used as house-keeping genes. Relative quantification of VEGF and VEGFR-2 mRNA was analyzed by a comparative threshold cycle (C_T) method.

Protein expression

A similar protocol was applied to hippocampi from *in vivo* models and to OHCs. At different time-points after seizure induction the tissues were lysed in sample buffer containing Tris-EDTA 1X (Sigma), 100 mM NaCl, 1% Triton, 1X protease inhibitor. Samples underwent

centrifugation at 1,000 g at 4°C for 10 min and the supernatant containing proteins was stored.

Protein concentration was determined by using a BCA-Kit assay (Sigma). Protein samples (40 µg) boiled in Laemmli buffer containing 2-mercaptoethanol were loaded onto a Nupage Novex 4-12% Bis-Tris Midi gel (Invitrogen), separated electrophoretically and transferred to polyvinyldifluoridine membranes (Hybond-C-extra, Amersham Biosciences). Membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies raised against VEGF, VEGFR-2, ZO-1, occludin, claudin-5 and actin then with secondary antibodies for 1 h at RT (see Table 1) and revealed by chemoluminescence detection (Western Lightening, Perkin Elmer).

VEGF secretion

Determination of VEGF released in culture medium was achieved by standard ELISA using the Quantikine Immunoassay (R&D Systems) according to the manufacturer's protocol.

Data analysis and statistics

Quantification of vascular density

We used the point-counting method (58), and quantified the vascular network in the different experimental conditions as previously described (13). Briefly, a 5 x 5 grid was superposed to the digitized image and the number of labelled vessels crossing the grid was counted. The score was expressed in arbitrary units of vascular density for a 1 mm^2 area. For *in vivo* models, we analysed the hippocampus at 6 different levels of anteriority in 5 rats per period (acute, silent and chronic in pilocarpine model and scores 1 to 5 in kindling model) and in their age-matched, sham-injected controls. For *in vitro* models we evaluated vascular density of the whole slices in different treatments: control n = 250, kainate n = 100, bicuculline n = 100, with or without anti-VEGF treatment. Results were expressed for each epileptogenic

condition *in vivo* or *in vitro* in percent of matched-controls. Statistical analysis was performed by Kruskall-Wallis test for *in vivo* models and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher test for OHCs ($p<0.05$ is significant).

Western blot

Western blots were analyzed by densitometry using Photoshop and ImageJ. For *in vivo* models, n = 5 rats in each condition; for *in vitro*, n = 1,000 for control slices, n = 450 for kainate and n = 450 bicuculline, with or without anti-VEGF treatment. Statistical analysis was performed by Kruskall-Wallis test ($p<0.05$ is significant).

ELISA

VEGF concentration was determined with linear regression according to the manufacturer's protocol on 120 control slices, 60 kainate-treated slices, 60 bicuculline-treated slices, with or without anti-VEGF antibody. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Fisher test ($p<0.05$ is significant).

LDH

The cytotoxicity after seizures (control n = 25, kainate n = 15, bicuculline n = 15) was evaluated in percent of the maximal toxicity obtained by glutamate exposure (n = 35):

[(seizure OD – control OD) / (glutamate OD – control OD)] x 100

Statistical analysis was performed using Student "t" test for unpaired data ($p<0.05$ is significant).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Federica Bertaso for critically reading the manuscript, Nicole Lautredou-Audouy for confocal microscopy at the Centre Régional d'Imagerie Cellulaire and Dr. Veronique Saywell for her help in qRT-PCR experiments.

REFERENCES (58)

1. Gloor, P. 1991. Neurobiological substrates of ictal behavioral changes. *Adv. Neurol.* **55**:1-34.
2. Pitkanen, A., and Sutula, T.P. 2002. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal lobe epilepsy. *Lancet Neurol.* **1**:173-181.
3. Crespel, A., Coubes, P., Rousset, M.C., Brana, C., Rougier, A., Rondouin, G., Bockaert, J., Baldy-Moulinier, M., and Lerner-Natoli, M. 2002. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Res.* **952**:159-169.
4. Fabene, P.F., Mora, G.N., Martinello, M., Rossi, B., Merigo, F., Ottoboni, L., Bach, S., Angiari, S., Benati, D., Chakir, A., Zanetti, L., Schio, F., Osculati, A., Marzola, P., Nicolato, E., Homeister, J.W., Xia, L., Lowe, J.B., McEver, R.P., Osculati, F., Sharbati, A., Butcher, E.C., Constantin, G. 2008. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nat. Med.* **14**:1377-1383.
5. Ivens, S., Kaufer, D., Flores, L.P., Bechmann, I., Zumsteg, D., Tomkins, O., Seiffert, E., Heinemann, U., and Friedman, A. 2007. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain.* **130**:535-547.
6. Lerner-Natoli, M., Montpied, P., Rousset, M.C., Bockaert, J., and Rondouin, G. 2000. Sequential expression of surface antigens and transcription factor NFkappaB by hippocampal cells in excitotoxicity and experimental epilepsy. *Epilepsy Res.* **41**:141-154.
7. Ryu, J.K., and McLarnon, J.G. 2008. VEGF receptor antagonist Cyclo-VEGI reduces inflammatory reactivity and vascular leakiness and is neuroprotective against acute excitotoxic striatal insult. *J. Neuroinflammation.* **5**:18.
8. Seiffert, E., Dreier, J.P., Ivens, S., Bechmann, I., Tomkins, O., Heinemann, U., and Friedman, A. 2004. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J. Neurosci.* **24**:7829-7836.
9. Tomkins, O., Shelef, I., Kaizerman, I., Eliushin, A., Afawi, Z., Misk, A., Gidon, M., Cohen, A., Zumsteg, D., and Friedman, A. 2008. Blood-brain barrier disruption in post-traumatic epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **79**:774-777.
10. Turrin, N.P., and Rivest, S. 2004. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol. Dis.* **16**:321-334.
11. Van Vliet, E.A.D.C., Araujo, S., Redeker, S., Van Schaik, R., Aronica, E., and Gorter, J.A. 2007. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain.* **130**: 521-34.
12. Vezzani, A., and Granata, T. 2005. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia.* **46**:1724-1743.
13. Rigau, V., Morin, M., Rousset, M.C., de Bock, F., Lebrun, A., Coubes, P., Picot, M.C., Baldy-Moulinier, M., Bockaert, J., Crespel, A., and Lerner-Natoli, M. 2007. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain.* **130**:1942-1956.
14. Croll, S.D., Goodman, J.H., and Scharfman, H.E. 2004. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in seizures: a double-edged sword. *Adv. Exp. Med. Biol.* **548**:57-68.
15. Newton, S.S., Girgenti, M.J., Collier, E.F., and Duman, R.S. 2006. Electroconvulsive seizure increases adult hippocampal angiogenesis in rats. *Eur. J. Neurosci.* **24**:819-828.
16. Nicoletti, J.N., Shah, S.K., McCloskey, D.P., Goodman, J.H., Elkady, A., Atassi, H., Hylton, D., Rudge, J.S., Scharfman, H.E., and Croll, S.D. 2008. Vascular endothelial

growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus. *Neuroscience.* **151**:232-241.
17. Kowanetz, M., and Ferrara, N. 2006. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin. Cancer. Res.* **12**:5018-5022.
18. Ahmad, S., Hewett, P.W., Wang, P., Al-Ani, B., Cudmore, M., Fujisawa, T., Haigh, J.J., le Noble, F., Wang, L., Mukhopadhyay, D., and Ahmad, A. 2006. Direct Evidence for Endothelial Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Function in Nitric Oxide-Mediated Angiogenesis. *Circ. Res.* **99**:715-22.
19. Sandoval, K.E., and Witt, K.A. 2008. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol. Dis.* **32**:200-219.
20. Zhang, Z., and Chopp, M. 2002. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**:62-66.
21. Turski, L., Ikonomidou, C., Turski, W.A., Bortolotto, Z.A., and Cavalheiro, E.A. 1989. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse.* **3**:154-171.
22. Diehl, R.G., Smialowski, A., and Gotwo, T. 1984. Development and persistence of kindled seizures after repeated injections of pentylenetetrazol in rats and guinea pigs. *Epilepsia.* **25**:506-510.
23. Bendfeldt, K., Radojevic, V., Kapfhammer, J., and Nitsch, C. 2007. Basic fibroblast growth factor modulates density of blood vessels and preserves tight junctions in organotypic cortical cultures of mice: a new in vitro model of the blood-brain barrier. *J. Neurosci.* **27**:3260-3267.
24. Moser, K.V., Schmidt-Kastner, R., Hinterhuber, H., and Humpel, C. 2003. Brain capillaries and cholinergic neurons persist in organotypic brain slices in the absence of blood flow. *Eur. J. Neurosci.* **18**:85-94.
25. de Bock, F., Dornand, J., and Rondouin, G. 1996. Release of TNF alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. *Neuroreport.* **7**:1125-1129.
26. Kovacs, R., Schuchmann, S., Gabriel, S., Kardos, J., and Heinemann, U. 2001. Ca2+ signalling and changes of mitochondrial function during low-Mg2+-induced epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* **13**:1311-1319.
27. Montpied, P., de Bock, F., Rondouin, G., Niel, G., Briant, L., Courseau, A.S., Lerner-Natoli, M., and Bockaert, J. 2003. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **115**:111-120.
28. Routbort, M.J., Bausch, S.B., and McNamara, J.O. 1999. Seizures, cell death, and mossy fiber sprouting in kainic acid-treated organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience.* **94**:755-765.
29. McCormack, P.L., and Keam, S.J. 2008. Bevacizumab: a review of its use in metastatic colorectal cancer. *Drugs.* **68**:487-506.
30. Dietrich, J., Norden, A.D., and Wen, P.Y. 2008. Emerging antiangiogenic treatments for gliomas - efficacy and safety issues. *Curr. Opin. Neurol.* **21**:736-744.
31. Jager, R.D., Mieler, W.F., and Miller, J.W. 2008. Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **358**:2606-2617.
32. Lynch, S.S., and Cheng, C.M. 2007. Bevacizumab for neovascular ocular diseases. *Ann. Pharmacother.* **41**:614-625.
33. Norden, A.D., Young, G.S., Setayesh, K., Muzikansky, A., Klufas, R., Ross, G.L., Ciampa, A.S., Ebbeling, L.G., Levy, B., Drappatz, J., Kesari, S., Wen, P.Y.. 2008.

Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology.* **70**:779-787.
34. Pereira de Vasconcelos, A., Ferrandon, A., and Nehlig, A. 2002. Local cerebral blood flow during lithium-pilocarpine seizures in the developing and adult rat: role of coupling between blood flow and metabolism in the genesis of neuronal damage. *J Cereb. Blood Flow Metab.* **22**:196-205.
35. Bazzoni, G., and Dejana, E. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* **84**:869-901.
36. Harhaj, N.S., and Antonetti, D.A. 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**:1206-1237.
37. de Bock, F., Derijard, B., Dornand, J., Bockaert, J., and Rondouin, G. 1998. The neuronal death induced by endotoxic shock but not that induced by excitatory amino acids requires TNF-alpha. *Eur. J. Neurosci.* **10**:3107-3114.
38. Newton, S.S., Collier, E.F., Hunsberger, J., Adams, D., Terwilliger, R., Selvanayagam, E., and Duman, R.S. 2003. Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors. *J. Neurosci.* **23**:10841-10851.
39. Cheranov, S.Y., Karpurapu, M., Wang, D., Zhang, B., Venema, R.C., and Rao, G.N. 2008. An essential role for SRC-activated STAT-3 in 14,15-EET-induced VEGF expression and angiogenesis. *Blood.* **111**:5581-5591.
40. Pages, G., and Pouyssegur, J. 2005. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc. Res.* **65**:564-573.
41. Choi, J.S., Kim, S.Y., Park, H.J., Cha, J.H., Choi, Y.S., Kang, J.E., Chung, J.W., Chun, M.H., and Lee, M.Y. 2003. Upregulation of gp130 and differential activation of STAT and p42/44 MAPK in the rat hippocampus following kainic acid-induced seizures. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **119**:10-18.
42. Feng, Z., Chang, R.C., Bing, G., Hudson, P., Tiao, N., Jin, L., and Hong, J.S. 1999. Long-term increase of Sp-1 transcription factors in the hippocampus after kainic acid treatment. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **69**:144-148.
43. Feng, Z., Zhang, W., Hudson, P., Bing, G., Feng, W., and Hong, J.S. 1997. Characterization of the long-lasting activator protein-1 complex induced by kainic acid treatment. *Brain Res.* **770**:53-59.
44. Ferriero, D.M. 2005. Protecting neurons. *Epilepsia.* **46** Suppl 7:45-51.
45. Schiera, G., Proia, P., Alberti, C., Mineo, M., Savettieri, G., and Di Liegro, I. 2007. Neurons produce FGF2 and VEGF and secrete them at least in part by shedding extracellular vesicles. *J. Cell Mol. Med.* **11**:1384-1394.
46. McCloskey, D.P., Croll, S.D., and Scharfman, H.E. 2005. Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. *J. Neurosci.* **25**:8889-8897.
47. Gavard, J., and Gutkind, J.S. 2006. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.* **8**:1223-1234.
48. Holmes, K., Roberts, O.L., Thomas, A.M., and Cross, M.J. 2007. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal.* **19**:2003-2012.
49. Rondouin, G., Bockaert, J., and Lerner-Natoli, M. 1993. L-nitroarginine, an inhibitor of NO synthase, dramatically worsens limbic epilepsy in rats. *Neuroreport.* **4**:1187-1190.
50. Yang, Y., Estrada, E.Y., Thompson, J.F., Liu, W., and Rosenberg, G.A. 2007. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is

reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **27**:697-709.

51. Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* **16**:1-13.
52. Zlokovic, B.V. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* **57**:178-201.
53. Kunz, A., Park, L., Abe, T., Gallo, E.F., Anrather, J., Zhou, P., and Iadecola, C. 2007. Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *J. Neurosci.* **27**:7083-7093.
54. Follesa, P., Tarantino, A., Floris, S., Mallei, A., Porta, S., Tuligi, G., Cagetti, E., Caddeo, M., Mura, A., Serra, M., and Biggio, G. 1999. Changes in the gene expression of GABAA receptor subunit mRNAs in the septum of rats subjected to pentylenetetrazol-induced kindling. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **70**:1-8.
55. Stoppini, L., Buchs, P.A., and Muller, D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods.* **37**:173-182.
56. Koh, J.Y., and Choi, D.W. 1987. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Methods.* **20**:83-90.
57. Macklis, J.D., and Madison, R.D. 1990. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J. Neurosci. Methods.* **31**:43-46.
58. de Paz, P., and Barrio, J.P. 1985. Stereological parameters from the analysis of the cell micrographs either by manual point-counting methods or by using a semi-automatic system: a BASIC program for ZX-Spectrum personal computer. *Comput. Biol. Med.* **15**:153-158.

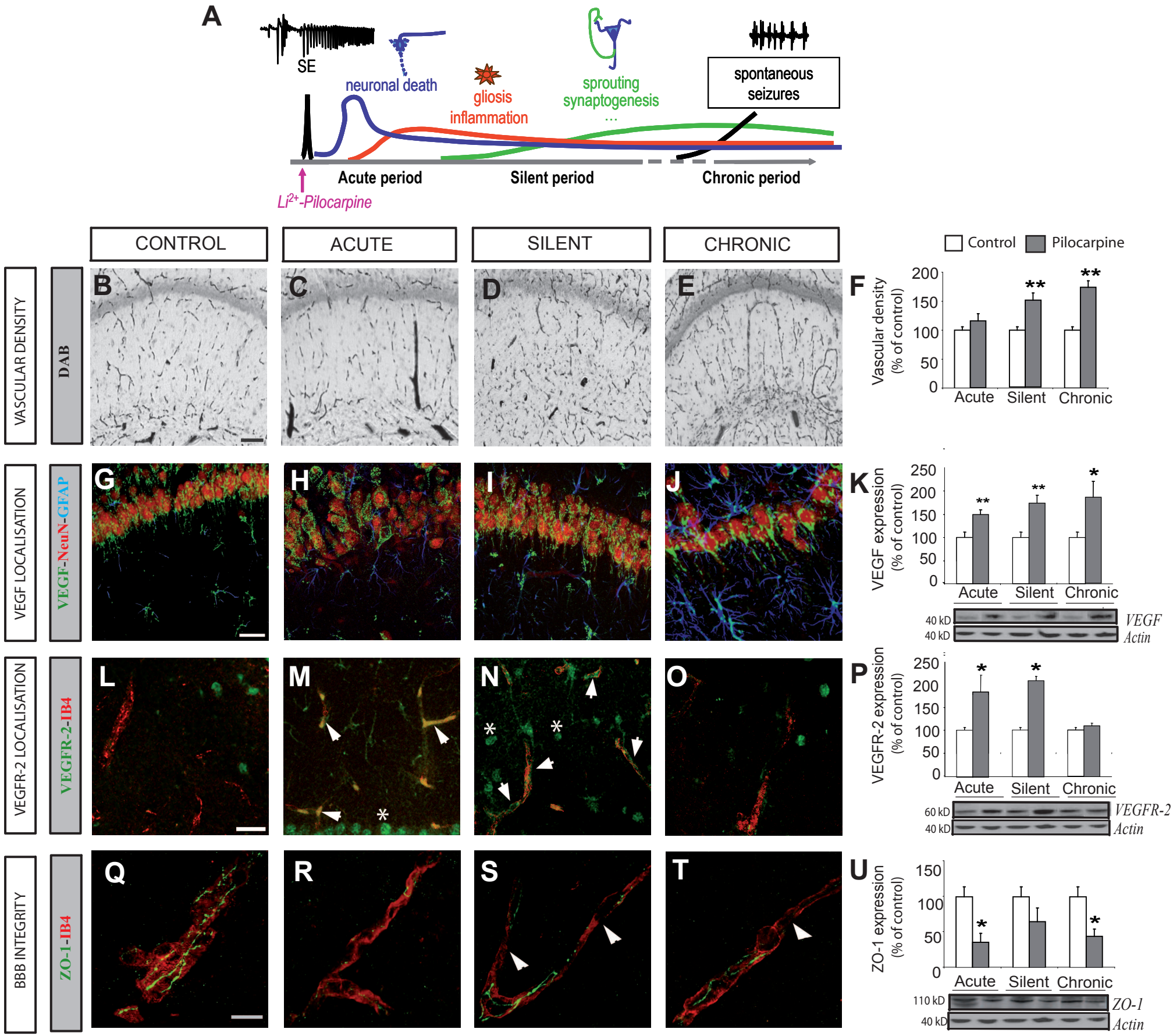


Figure 1

Angiogenesis and BBB disruption are persistent in the pilocarpine model of chronic epilepsy. **(A)** Scheme depicting the pilocarpine model of chronic epilepsy. **(B-E)** Vascularisation of hippocampus CA1 area in control and epileptic rats sacrificed during acute, silent and chronic periods. Scale bar: 200 µm. **(F)** Quantification by point-counting method of vascular density. Data are expressed in percent of control (n = 6 for each period). Kruskall-Wallis test ** $p<0.01$. **(G-J)** Confocal images of triple labelling of VEGF (green), NeuN (red) and GFAP (blue). Scale bar: 50µm. **(K)** Western blotting of VEGF and quantification expressed in percent of control (n = 6 for each period). Kruskall-Wallis test * $p<0.05$ and ** $p<0.01$. **(L-O)** Confocal images of double labelling of VEGFR-2 (green) and IB4 (red). Arrowheads indicate vascular expression of VEGFR-2 and asterisks neuronal expression of VEGFR-2. Scale bar: 25µm. **(P)** Western blotting of VEGFR-2 and quantification expressed in percent of control (n = 6 for each period). Kruskall-Wallis test * $p<0.05$. **(Q-T)** Confocal images of double labelling of ZO-1 (green) and IB4 (red). Arrowheads indicate the loss of tight junctions. Scale bar: 10 µm. **(U)** Western blotting of ZO-1 and quantification expressed in percent of control (n = 6 for each period). Kruskall-Wallis test * $p<0.05$.

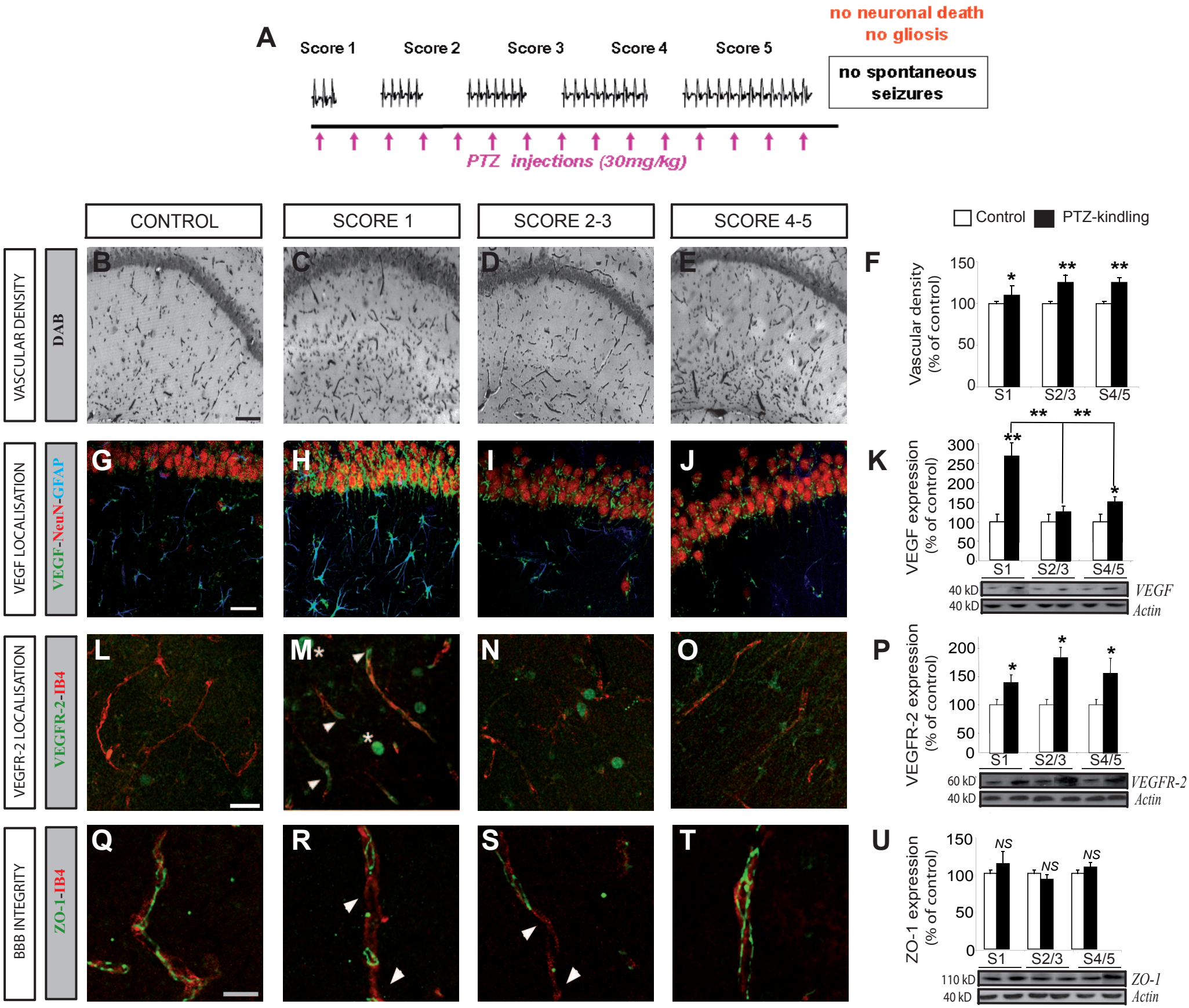


Figure 2

Angiogenesis and BBB disruption are transient in the kindling model. (**A**) Scheme depicting the chemical kindling. (**B-E**) Vascularisation of hippocampus CA1 area in control and kindled rats sacrificed once they reached score 1-5. Scale bar: 200 µm. (**F**) Quantification of vascular density by point-counting method. Data are expressed as percent of control (n = 5 for each score). Kruskall-Wallis test ** $p<0.01$. (**G-J**) Confocal images of triple labelling of VEGF (green), NeuN (red) and GFAP (blue). Scale bar: 50 µm. (**K**) Western blotting of VEGF and quantification expressed in percent of control (n = 5 for each score). Kruskall-Wallis test * $p<0.05$ and ** $p<0.01$. (**L-O**) Confocal images of double labelling of VEGFR-2 (green), IB4 (red). Arrowheads indicate vascular expression of VEGFR-2 and asterisks neuronal expression of VEGFR-2. Scale bar: 25 µm. (**P**) Western blotting of VEGFR-2 and quantification expressed as percent of control (n = 5 for each score). Kruskall-Wallis test * $p<0.05$. (**Q-T**) Confocal images of double labelling of ZO-1 (green) and IB4 (red). Arrowheads indicate the loss of tight junctions. Scale bar: 10 µm. (**U**) Western blotting of ZO-1 and quantification expressed in percent of control (n = 6 for each period). Kruskall-Wallis test NS: no significant.

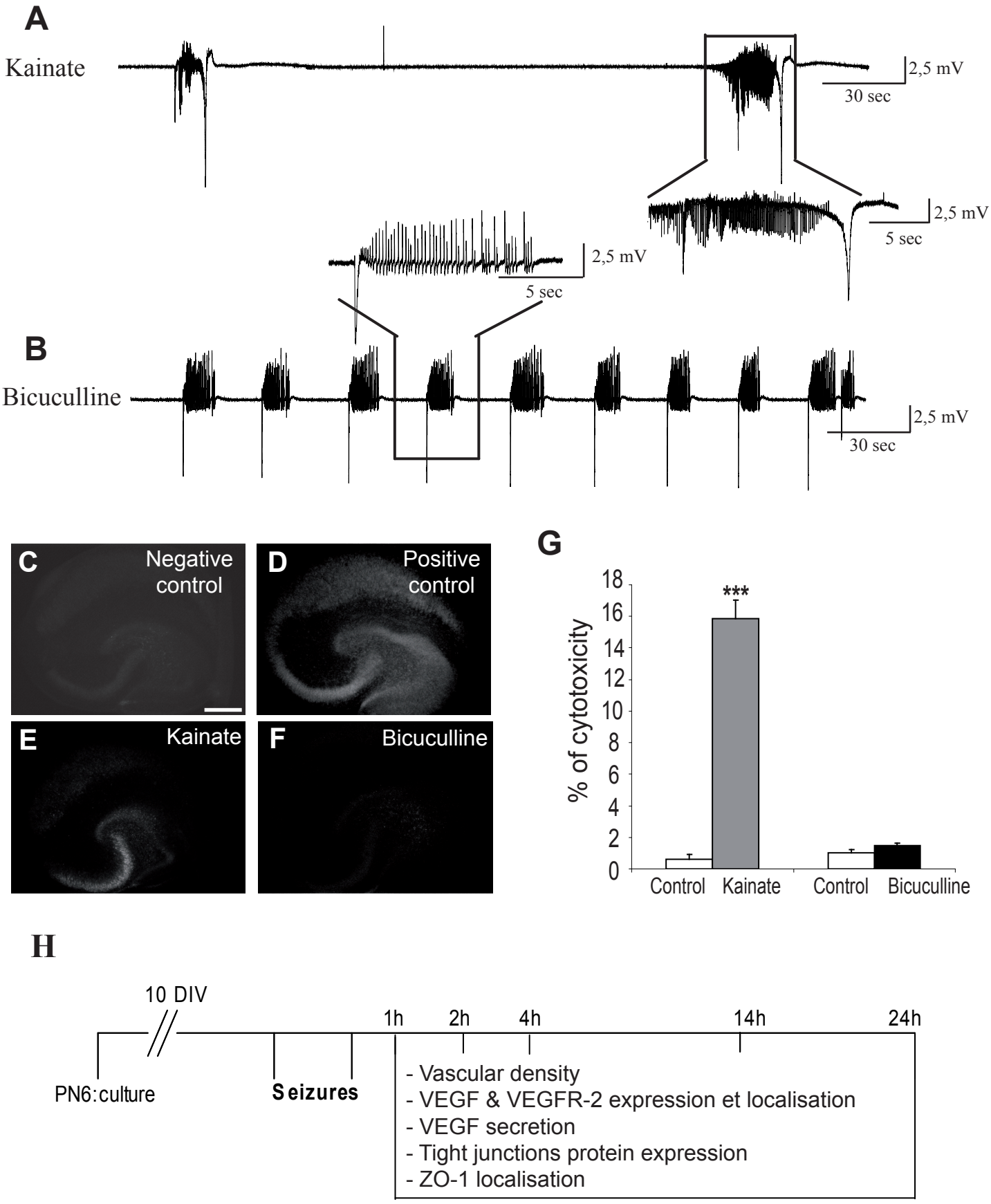


Figure 3

In vitro models of seizures with or without lesions. (**A-B**) Extracellular recordings from CA1 area. (**C**) Images of PI fluorescence 24 h after application of kainate (25 µM), bicuculline (10 µM) or glutamate (25 mM, positive control of cytotoxicity). Scale bar: 400 µm. (**D**) Effects of kainate and bicuculline on cytotoxicity. LDH activity was measured 24 h after treatment. Results are expressed as percent of cytotoxicity (n = 20 for each treatment). Student t-test, unpaired data; *** $p<0.001$. (**E**) Scheme of experimental design. Seizures are induced by treatment with kainate or bicuculline. Investigations on VEGF and VEGFR-2 expression and BBB integrity are performed at different time-points between 1 h and 24 h after seizures.

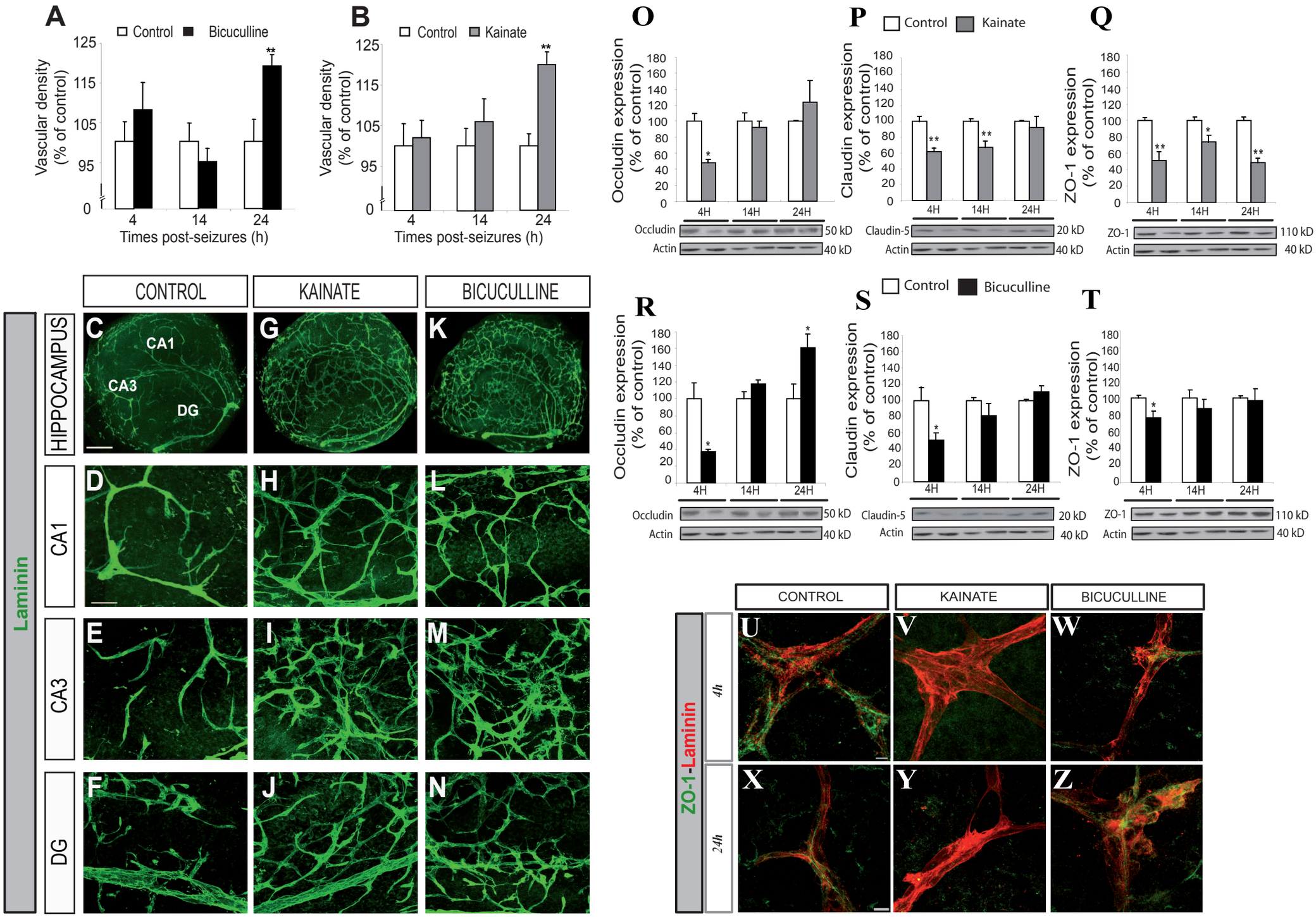


Figure 4

Kinetics of neovascularisation and BBB integrity after seizures. (**A-B**) Quantification of vascular density in kainate or bicuculline models 4, 14 and 24 h PS. Data are expressed in percent of control (n = 20 for each time). ANOVA followed post hoc test ** $p<0.01$. (**C-K**) Immunostaining of laminin, in whole slices, 24 h after seizures in both models. Scale bar: 400 µm. (**D-N**) Confocal images of laminin staining in three main hippocampus areas: CA1, CA3 and dentate gyrus (DG). Scale bar: 50 µm. (**O-T**) Western blot and quantification of the expression of three tight junction proteins (occludin, claudin-5 and ZO-1). Data are expressed in percent of control (n = 5 for each time). Kruskall-Wallis test * $p<0.05$ and ** $p<0.01$. (**U-Z**) Confocal images of double labelling of ZO-1 (green) and laminin (red) 4 h and 24 h PS. Scale bar: 10 µm.

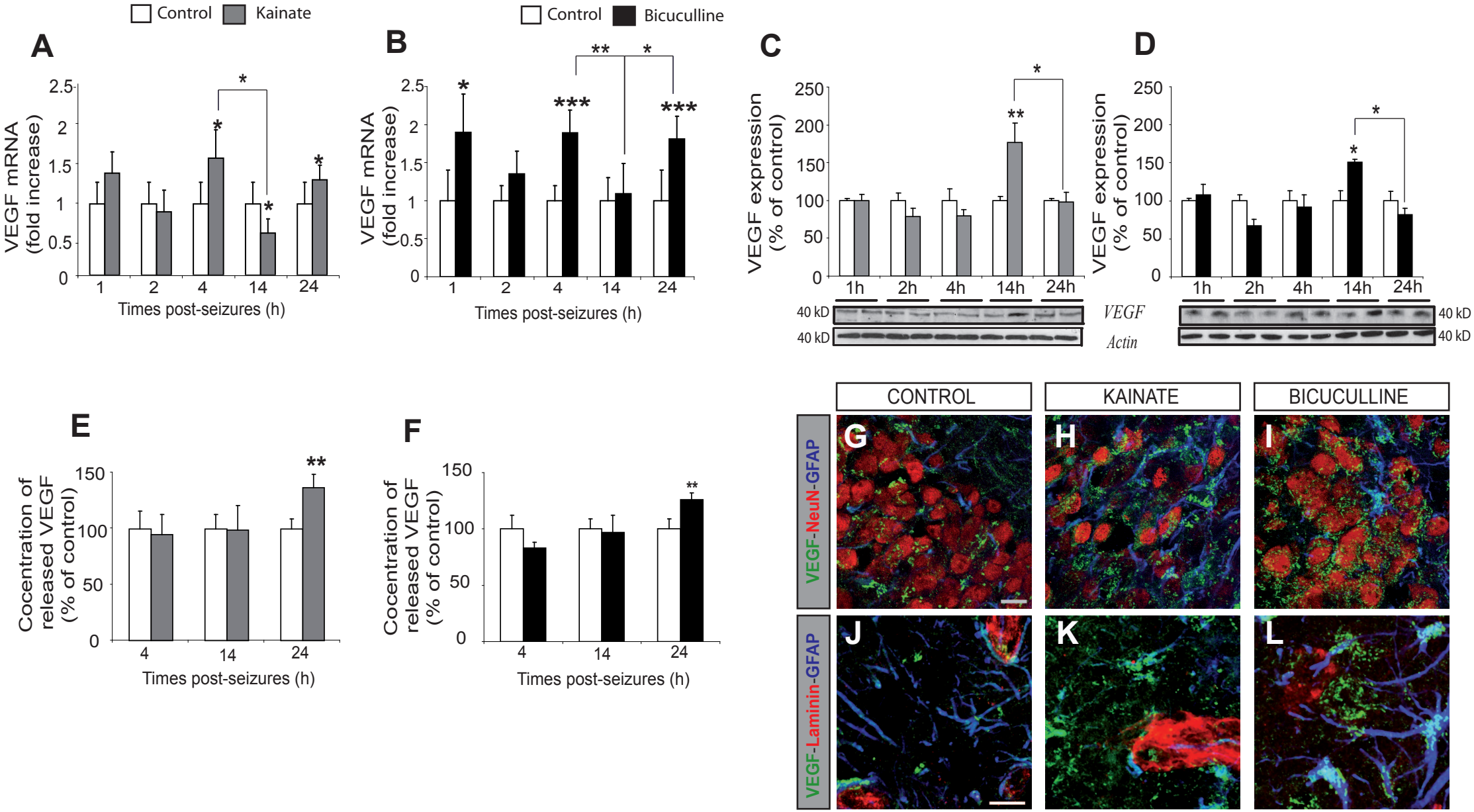


Figure 5

Kinetics of expression, localisation and secretion of VEGF after in vitro seizures. (**A-B**) Quantitative RT-PCR of VEGF mRNA isolated from OHCs treated with kainate or bicuculline (n = 3 per condition). Student t-test * $p<0.05$, *** $p<0.005$. (**C-D**) Western blotting of VEGF and quantification expressed in percent of control (n = 4 per condition). Kruskall-Wallis test * $p<0.05$ and ** $p<0.01$. (**E-F**) ELISA of secreted VEGF after seizures. ANOVA followed post hoc test ** $p<0.01$. (**G-I**) Confocal images of triple labelling of VEGF (green), NeuN (red) and GFAP (blue) in sectioned slices of control and treated OHCs (14 h PS). Scale bar: 10 µm. (**J-L**) Confocal images of triple labelling of VEGF (green), laminin (red) and GFAP (blue) in sectioned slices of control and treated OHCs (14 h PS). Scale bars: 10 µm.

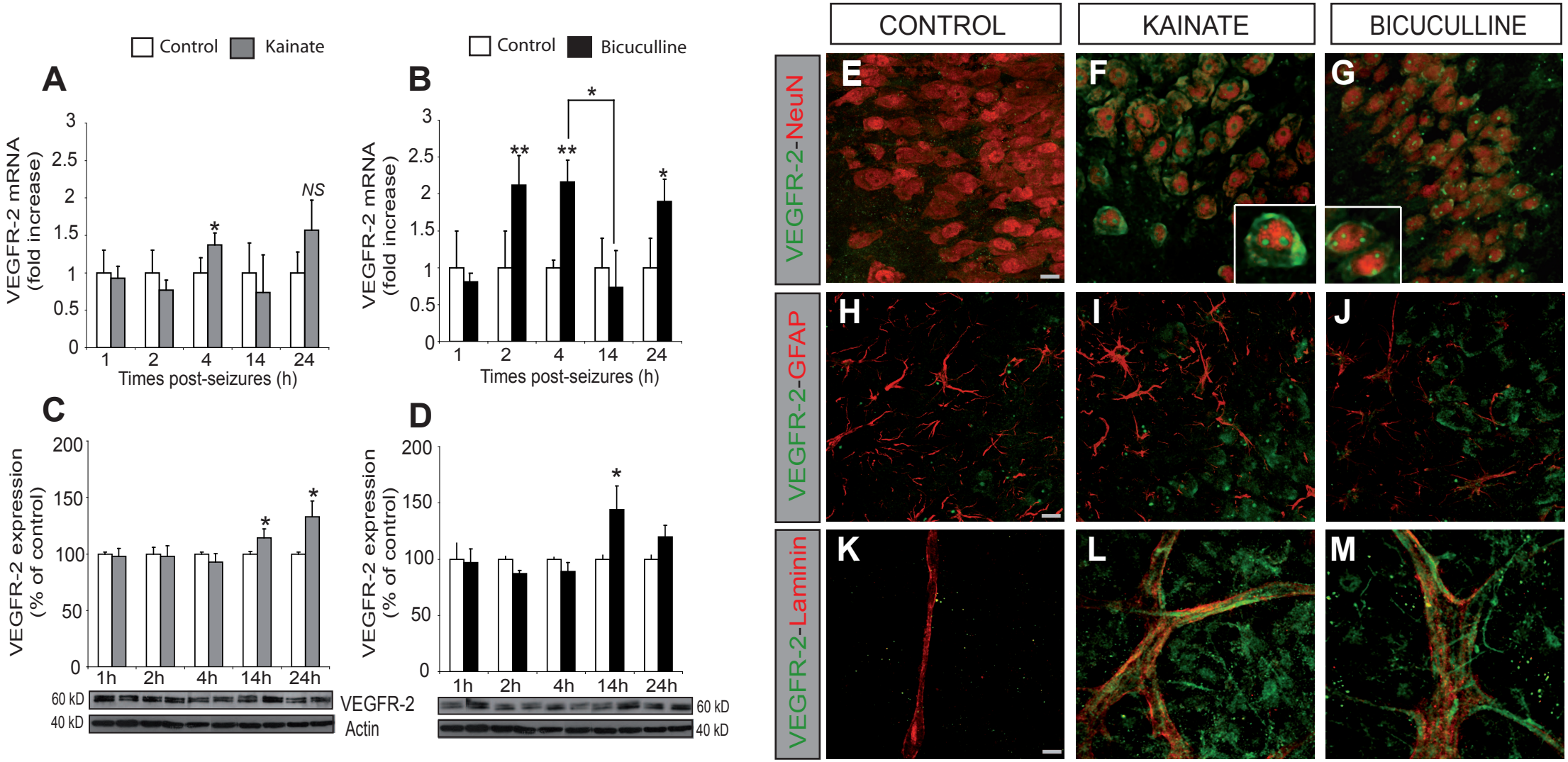


Figure 6

Kinetics of expression and localisation of VEGFR-2 after *in vitro* seizures. (**A-B**) Quantitative RT-PCR of VEGFR-2 mRNA isolated from OHCs treated with kainate or bicuculline (n = 3 per condition). Statistical test: Student t-test * $p<0.05$, *** $p<0.005$. (**C-D**) Western blotting of VEGFR-2 and quantification expressed in percent of control (n = 4 per condition). Kruskall-Wallis test * $p<0.05$ and ** $p<0.01$. (**E-G**) Confocal images of double labelling of VEGFR-2 (green) and NeuN (red) in sectioned slices of control and treated OHCs (14 h PS). Scale bar: 10 µm. (**H-J**) Confocal images of double labelling of VEGFR-2 (green) and GFAP (red) in sectioned slices of control and treated OHCs (14 h PS). Scale bar: 10 µm. (**K-M**) Confocal images of double labelling of VEGFR-2 (green) and laminin (red) in whole slices of control and treated OHCs (14 h PS). Scale bar: 10 µm.

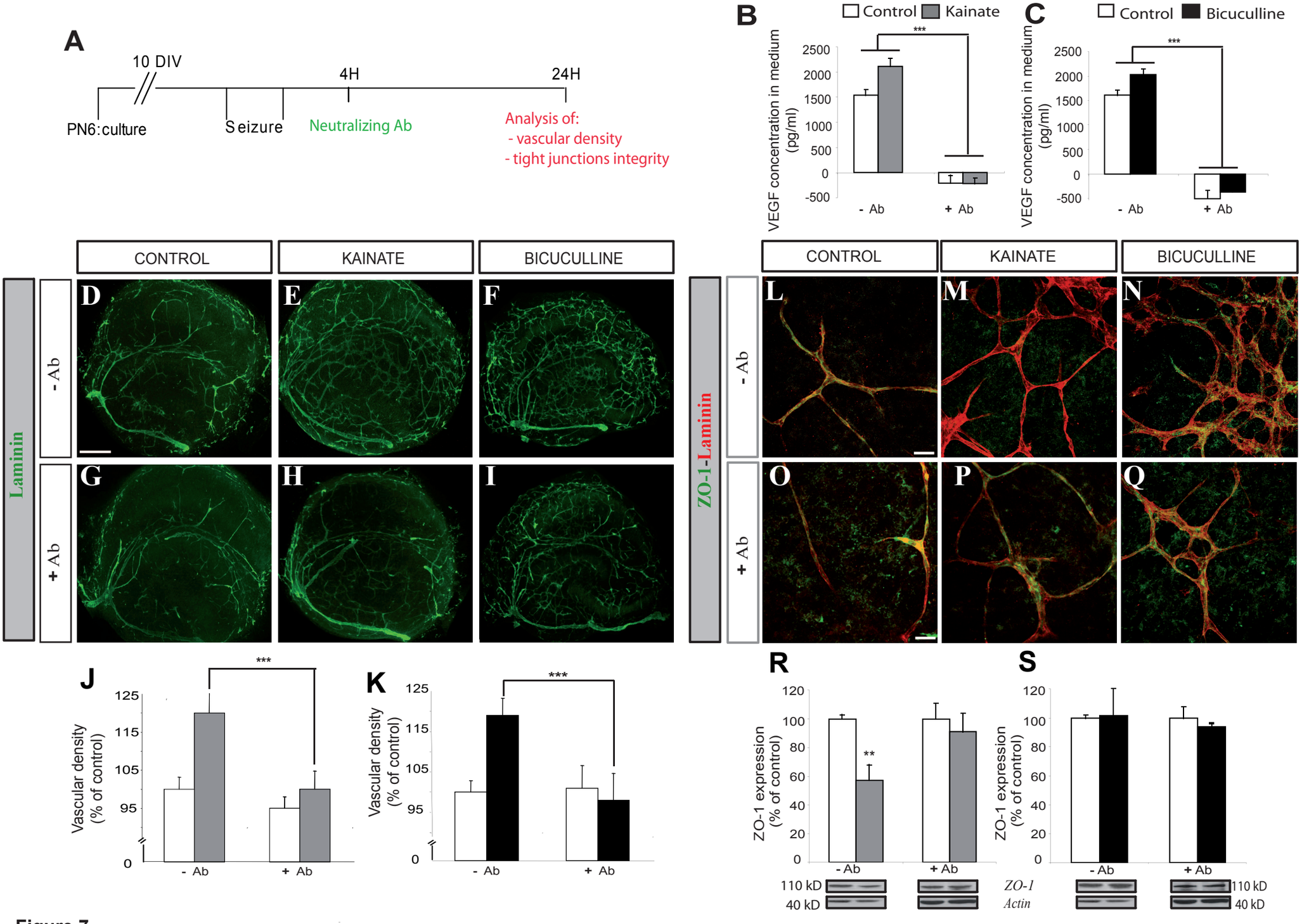


Figure 7

VEGF is the main actor of seizure-induced angiogenesis and BBB disruption. (**A**) Scheme of the experimental design of VEGF neutralization. (**B-C**) ELISA of secreted VEGF in the medium, 24 h after application of anti-VEGF antibody (n = 15). ANOVA followed post hoc test *** $p<0.005$. (**D-I**) Immuno-staining of laminin 24 h after application of kainate or bicuculline with or without antibody. Scale bar: 400 µm. (**J-K**) Quantification of vascular density by point counting method. Results are expressed in percent of control (n=15). ANOVA followed post hoc test *** $p<0.005$. (**L-Q**) Confocal images of double labelling of ZO-1 (green) and laminin (red) 24 h after application of VEGF neutralizing antibody. Scale bar: 10 µm. (**R, S**) Western blotting of ZO-1 24 h PS with or without antibody and quantification expressed in percent of control (n = 4 per condition). Kruskall-Wallis test ** $p<0.01$.

Table 1: primary and secondary antibodies

PRIMARY ANTIBODIES	Source	Isotype	Clone or Reference	Dilution	Supplier	IHC	WB
Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	*Mouse monoclonal *Rabbit polyclonal	IgG1 kappa IgG	6F2	1/500 1/1000	Dako Dako	+	
NeuN	Mouse monoclonal	IgG1	MAB377	1/500	Chemicon	+	
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Goat polyclonal	IgG	Sc-1836	1/200 1/100	Santa Cruz Biotechnology	+	+
VEGFR-2	*Rabbit polyclonal *Rabbit polyclonal	IgG	Sc-504	1/200 1/1000	Santa Cruz Biotechnology Abcam	+	+
Claudin-5	Mouse monoclonal			1/400	Zymed		+
Occludin	Rabbit polyclonal			1/400	Zymed		+
Zonula Occludens-1 (ZO-1)	Rabbit polyclonal	IgG	61-7300	1/200 1/800	Zymed	+	+
Laminin	*Mouse monoclonal *Rabbit polyclonal	IgG1K IgG	2E8 L9393	1/3000 1/4000	Chemicon Sigma-Aldrich	+ +	
Actin	Mouse monoclonal	IgG	ACTN05	1/1000	LabVision		+

OTHER MARKERS							
IB4	Biotinylated Isolectin B4		L-3759	1/200	Sigma-Aldrich	+	
Texas Red	Avidin			1/100	Dako Glostrup	+	
SECONDARY ANTIBODIES CONJUGATED TO:							
Alexa 488	*Donkey anti-goat *Goat anti-rabbit	IgG IgG	A11055 A11008	1/2000 1/2000	Invitrogen	+ +	
Cy3	Donkey anti-mouse	IgG		1/500	Jackson	+	
AMCA	Donkey anti-rabbit	IgG	711-155-152	1/100	Jackson	+	
HRP	*Goat anti-rabbit *Goat anti-mouse *Rabbit anti-gaoat			1/4000 1/4000 1/2000	Jackson		+ + +

TABLE 2 : Modèles d'étude de l'épileptogénèse

MODELES *IN VIVO*						
Modèles *in vivo* induits						
Modèle	***Induction :***	***Type de crises :***	***Phase de latence :***	***Crises spontanées:***	***Lésions :***	***Utilisé pour :***
Kindling	- PTZ -Stimulation électrique	De simples clonies à généralisées	Non	Non	Très peu	- Test AEDs - Plasticité synaptique
SE	- Kainate - Pilocarpine - Stimulation continue électrique	SE	Oui	Oui	Mort cellulaire Gliose Neurogenèse	- Etude de la phase latente - Test AEDs
Hyper-Thermie	-piscine chauffée -hyperthermie ambiante	Convulsions	Non	Non	Très peu	Modèle de convulsions fébriles chez l'enfant
Post-Traumatique	Trauma crânien	SE	Oui	Oui mais origine frontale	Mort cellulaire Gliose	Peu utilisé mais en développement
Ischémie post-natale	Hypoxie à p10-12	Tonico-clonique	Non	Non	Mort cellulaire	Epilepsie post-anoxique ou ischémique

Modèles *in vivo* Génétiques			
Modèles	**Mutations**	**Types de crise**	**Utilisations**
Modèles spontanés	Canaux Ca2+ Canaux K+ Récepteur IP3	Absences Tonico-clonique Tonico clonique	Trouver des mutations homologues chez l'homme Importance des canalopathies et réceptopathies
Modèles homologues (mutagenèse)	Canaux K+ Inhibiteur cystéine protéase Ubiquitine ligase Sous-unité $GABA_A$ Canal Na+	Limbiques Tonico-clonique Myoclonique Tonico-clonique Myoclonique Limbique	Comprendre les épilepsies familiales
Mutations ciblées (exemples)	Canaux K+ Sous-unité GABA Glutamate decarboxylase Glutamate transporteur p35 mGlur7	Tonico-clonique Tonico-clonique Clonique Tonico-clonique Limbique Absence	Comprendre les mécanismes d'épileptogenèse

MODELES *IN VITRO*		
Modèles	***Types de cellules***	***Utilisations***
Modèles aigus	Tranches d'hippocampe ou de cortex	Hyperexcitabilité, propagation et synchronisation des crises
Modèles chroniques	Culture organotypique Cultures cellulaires	Etude des remaniements et excitotoxicité Excitabilité

Table 5 : Effets des facteurs angiogéniques et leurs récepteurs

Facteur	Régulation transcription	Isoformes	Expression tissulaire	Fonctions
VEGF	- Inflammation (sp1,AP1, STAT) - Hypoxie (HIF) -Stress (AP-1) -Hormones (progesterone, oestrogene) - STAT	VEGF-A (vegf121, 145,148,165, 183, 189,206)	Ubiquitaire (VEGF189,183,165,121) Placentaire (VEGF206,145)	-Migration -Prolifération des cellules endothéliales - Perméabilité vasculaire
		VEGF-B (vegf167,186)	Distribution large particulièrement coeur et muscle squelettique	
		VEGF-C	Foie, Coeur et cellules mesenchymateuses	
		VEGF-D	Foie, Coeur et cellules mesenchymateuses et colon	
		VEGF-E	Virus	-Survie virale dans cellules hôtes
		PIGF (pigf2,3 et 4)	Placenta	-Developpement du placenta
VEGFR	Hypoxie Facteurs de la famille bFGF	VEGFR1	Cellules vasculaires, hematopoeitique, monocytes et macrophages	-Régulation de l'activation de VEGFR2 (PI3Kinase)
		VEGFR2	Cellules vasculaires et neurales	- Prolifération cellulaire (Erk) - Migration cellulaire (P38 MAPK et PI3kinase) - Survie cellulaire (Akt) - Perméabilité cellulaire (PLCγ,src)
		VEGFR3	Cellules vasculaires, monocytes et macrophages	- Migration cellulaire (Erk) - Prolifération

				cellulaire - Survie cellulaire
NRP		NRP1	Cellules endothéliales, cellules nerveuses	- Potentialisation de l'activation de VEGFR2 - Régulation VEGFR2
		NRP2	Cellules endothéliales, cellules nerveuses	- Diminution de l'activité de VEGFR2 - Activation complète de VEGFR3
Héparine sulfate			Ubiquitaire	- Augmentation de liaison VEGFA sur VEGFR2 et inhibition sur VEGFR1
Intégrines		$\alpha v\beta 3$	Ubiquitaire	- Ancrage cellules endothéliales à la matrice - Réponse optimale à VEGFR2
Ang	Hypoxie Inflammatoires (Ap1, ESE-1) VEGF	Ang1 (1.5Kb, 1.3kb, 0.9 et 0.7)	Ubiquitaire notamment cerveaux et organes génitaux et digestifs	- Maintien de l'intégrité vasculaire
		Ang2	Ovaire, utérus et placenta	- Régulation de l'angiogenèse
		Ang3	Ubiquitaire mais faible	
		Ang4	Foie	
Tie Recepteurs	Hypoxie Inflammation	Tie1		
	Hypoxie	Tie 2	Cellules endothéliales, fibroblastes, neutrophiles et cellules neurales	- Survie cellulaire (PI3kinase, Erk, p38 MAPkinase) - Migration cellulaire (PI3kinase, MAPkinase) - Effet anti-inflammatoires (ABIN2)

		- Effets anti-perméables
Cytokines	CXC ELR+	- Prolifération - Migration - Survie
	CXC ELR-	Inhibition de l'angiogenèse
	TGF-β	- Régulation de l'angiogenèse
FGF	FGF1,2 et4	- Prolifération - Migration cellulaire via FGFR1 et 2
PDGF	PDGFA, B, C et D	- Migration - Prolifération -Stabilisation des vaisseaux via PDGFR
Ephrines	Ephrines A et B	- Mobilité - Régulation des cellules endothéliales (Ras/Gap)

Table 6 : Souris transgénique pour les facteurs angiogéniques
(Ribatti D, 2008 et Olsson Ak 2006)

Facteur		Viabilité	Effets
	vegf-a+/-	Létale E11/12	Défauts dans le développement vasculaire
	vegf-a-/-	Létale E9.5/10.5	Défauts très sévères dans le développement vasculaire
	vegf-a120/120	Létale à la naissance ou PN14	50% des souris meurent après la naissance d'hémorragies dans multiples organes ou à PN14 d'un défaut cardiaque.
	vegf-a164/164	Viable	Aucune anomalie
VEGF	vegf-a188/188	Viable	Défaut de développement de la rétine, nanisme …
	vegf-b-/-	Viable	Hypotrophie cardiaque, dysfonction de la vascularisation coronaire, pas de revascularisation post-ischémique
	VEGF-c surexpression	Viable	Hyperplasie des vaisseaux lymphatiques
	vegf-c-/-	Létale après la naissance	œdème et absence de vaisseaux lymphatiques
	vegf-c+/-	Viable	Œdème lymphatique
	vegf-d-/-	Viable	Développement normal. Hypotrophie des vaisseaux lymphatiques adjacents au foie
	pigf -/-	Viable	Faible angiogenèse post-ischémique, inflammation et cancer
	vegfr1 -/-	Létale E8.5/9.5	Augmentation de l'attachement des hemangioblastes, désorganisation vasculaire due a une surcroissance des cellules endothéliales
VEGFR	vegfr2-/-	Létale E8.5/9.5	Défauts de vasculogenèse
	vegfr3-/-	Létale	Défaut cardiovasculaire et remodelage vasculaire incomplet
	VEGFR3 surexpression	Viable	Inhibition de la lymphogenèse du fœtus , régression des vaisseaux lymphatiques
	nrp1 -/-	Létale	Défaut dans le pattern neural et régression vasculaire
Neuropiline	NRP-1 surexpression	Viable	Défaut cardiovasculaire, malformation cardiaque, excès de vaisseaux, dilatation, hémorragies
	nrp2 -/-	Létale à la naissance (40%)	Nanisme, défaut dans le pattern neural, sévère réduction des vaisseaux lymphatiques et des capillaires
	nrp1- nrp2 -/-	Létale E8.5	Défaut dans le développement vasculaire
	ang1 -/-	Létale	Vaisseaux immatures absence de cellules péri-

		E12.5	vasculaires. Dilatation des vaisseaux.
Angiopoétines	ang1 surexpression au niveau de la peau	Viable	Vascularisation importante. Vaisseaux compacts et stables
	ang2 surexpression	Létale E9.5	Défaut de maturation des vaisseaux comparables à ang1-/-
	tie 1 -/-	Létale	Défaut Cardiovasculaire, œdème et hémorragie
	tie 2 -/-	Létale	Défaut dans le remodelage et la stabilité vasculaire
Fibroblast Growth Factor-2	fgf2 -/-	Viable	Pas de défauts particuliers
	FGF-2 Surexpression	Viable	Réponse amplifiée à l'angiogenèse
Transforming Growth Factore β	tgf-β1 -/-	Létale E10.5	Développement anormal de la vascularisation
	tgfrβ2 -/-	Létale E10.5-11.5	Défaut de vascularisation
Platelet-derived growth factor-B	pdgf-B	Létale après la naissance	Hémorragies et défaut de recrutement de péricytes
	pdgfr-B -/-	Viable	Défaut vascularisation reins
Hypoxia inductible factor 1	hif-1α -/-	Létale	Désorganisation des vaisseaux, dilatation
Cadherine	ve-cadherine -/-	Létale E10	Défaut dans l'interaction cellule-cellule endothéliales
	n-cadherine	Létale E9.5	Défaut de développement du cœur
Ephrines	eph-B2 -/-	Létale E9.5-10.5	Défaut dans le remodelage vasculaire précoce
	eph-B4 -/-	Létale E9.5-10.5	Défaut dans le remodelage vasculaire précoce
Integrines	αv	Létale	Importante angiogenèse et vasculogenèse

Table 8 : Les principales protéines des jonctions cellulaires

	Protéines	Localisation	Fonctions	Interactions
Jonctions adhérentes AJs	**VE-cadhérine**	Protéine membranaire	Adhésion cellulaire	- β-caténine - plakoglobine
	N-cadhérine	Protéine membranaire	Adhésion cellulaire ECs-péricytes ou astrocytes	
	T-cadhérine	Protéine membranaire	Non connues	
	P-cadhérine	Protéine membranaire	Non connues	
	β-caténine	Protéine cytoplasmique	Contrôle de la perméabilité	-VE-cadhérine -α-caténine
	Plakoglobine	Protéine cytoplasmique	Régulation de la transcription	-Cadhérine
	p120ctn	Protéine cytoplasmique	-Protection des cadhérines -Répression de la transcription	-Cadhérine
	α-caténine	Protéine cytoplasmique	Liaison de β-caténine et plakoglobine à l'actine	-β-caténine -Plakoglobine
	Nectine	Protéine membranaire	Initiation de la formation des AJs ?	-Afadine
	Afadine	Protéine membranaire	Liaison dela nectine à l'actine	-Nectine -Actine
Jonctions serrées TJs	**Occludine**	Protéine membranaire	-Maintien des jonctions -Migration des neutrophiles -Signalisation intracellulaire	-ZO -Cingulines -Enzymes -Récepteurs -Connexines
	Claudines	Protéine membranaire	-sélectivité du transport paracellulaire -Augmentation du TEER	-ZO -MUPP1 -MMP
	JAMs	Protéine membranaire	-Stabilisation des jonctions -Extravasation de leucocyte -Adhésion plaquettes	-Intégrines
	Zonula occludens	Protéine cytoplasmique	-Maintien des jonctions (sauf ZO-3 qui déstabilise) -Localisation des TJs au niveau de la membrane	-Actine -Afadine -Cinguline -α-caténine -ZO -ZONAB -molécules de signalisation
	MAGI	Protéine cytoplasmique	-Dynamique du cytosquelette -Transduction du signal	
	AF-6 ou afadine	Protéine cytoplasmique		
	PAR3 ou 6	Protéine cytoplasmique	-Polarité des cellules	
	MUPP1	Protéine cytoplasmique		- Claudines
	Cingulines	Protéine cytoplasmique	-Développement embryonnaire -Régulation transcriptionnelle -Prolifération cellulaire - Formation des TJs	-ZO -JAM -Actine

Table 2 : Modèles d'étude de l'épileptogenèse

MODELES *IN VIVO*						
Modèles *in vivo* induits						
Modèle	***Induction :***	***Type de crises :***	***Phase de latence :***	***Crises spontanées:***	***Lésions :***	***Utilisé pour :***
Kindling	- PTZ -Stimulation électrique	De simples clonies à généralisées	Non	Non	Très peu	- Test AEDs - Plasticité synaptique
SE	- Kainate - Pilocarpine - Stimulation continue électrique	SE	Oui	Oui	Mort cellulaire Gliose Neurogenèse	- Etude de la phase latente - Test AEDs
Hyper-Thermie	-piscine chauffée -hyperthermie ambiante	Convulsions	Non	Non	Très peu	Modèle de convulsions fébriles chez l'enfant
Post-Traumatique	Trauma crânien	SE	Oui	Oui mais origine frontale	Mort cellulaire Gliose	Peu utilisé mais en développement
Ischémie post-natale	Hypoxie à p10-12	Tonico-clonique	Non	Non	Mort cellulaire	Epilepsie post-anoxique ou ischémique

Modèles *in vivo* Génétiques			
Modèles	**Mutations**	**Types de crise**	**Utilisations**
Modèles spontanés	Canaux Ca2+ Canaux K+ Récepteur IP3	Absences Tonico-clonique Tonico clonique	Trouver des mutations homologues chez l'homme Importance des canalopathies et réceptopathies
Modèles homologues (mutagenèse)	Canaux K+ Inhibiteur cystéine protéase Ubiquitine ligase Sous-unité $GABA_A$ Canal Na+	Limbiques Tonico-clonique Myoclonique Tonico-clonique Myoclonique Limbique	Comprendre les épilepsies familiales
Mutations ciblées (exemples)	Canaux K+ Sous-unité GABA Glutamate decarboxylase Glutamate transporteur p35 mGlur7	Tonico-clonique Tonico-clonique Clonique Tonico-clonique Limbique Absence	Comprendre les mécanismes d'épileptogenèse

MODELES *IN VITRO*		
Modèles	***Types de cellules***	***Utilisations***
Modèles aigus	Tranches d'hippocampe ou de cortex	Hyperexcitabilité, propagation et synchronisation des crises
Modèles chroniques	Culture organotypique Cultures cellulaires	Etude des remaniements et excitotoxicité Excitabilité

Table 5 : Facteurs angiogéniques et leurs rôles

Facteur	Régulation transcription	Isoformes	Expression tissulaire	Fonctions
VEGF	- Inflammation (sp1,AP1, STAT) - Hypoxie (HIF) -Stress (AP-1) -Hormones (progesterone, oestrogene) - STAT	VEGF-A (vegf121, 145,148,165, 183, 189,206)	Ubiquitaire (VEGF189,183,165,121) Placentaire (VEGF206,145)	-Migration -Prolifération des cellules endothéliales - Perméabilité vasculaire
		VEGF-B (vegf167,186)	Distribution large particulièrement coeur et muscle squelettique	
		VEGF-C	Foie, Coeur et cellules mesenchymateuses	
		VEGF-D	Foie, Coeur et cellules mesenchymateuses et colon	
		VEGF-E	Virus	-Survie virale dans cellules hôtes
		PIGF (pigf2,3 et 4)	Placenta	-Developpement du placenta
VEGFR	Hypoxie Facteurs de la famille bFGF	VEGFR1	Cellules vasculaires, hematopoeitique, monocytes et macrophages	-Régulation de l'activation de VEGFR2 (PI3Kinase)
		VEGFR2	Cellules vasculaires et neurales	- Prolifération cellulaire (Erk) - Migration cellulaire (P38 MAPK et PI3kinase) - Survie cellulaire (Akt) - Perméabilité cellulaire (PLCγ,src)
		VEGFR3	Cellules vasculaires, monocytes et macrophages	- Migration cellulaire (Erk) - Prolifération cellulaire

				- Survie cellulaire
NRP		NRP1	Cellules endothéliales, cellules nerveuses	- Potentialisation de l'activation de VEGFR2 - Régulation VEGFR2
		NRP2	Cellules endothéliales, cellules nerveuses	- Diminution de l'activité de VEGFR2 - Activation complète de VEGFR3
Héparine sulfate			Ubiquitaire	- Augmentation de liaison VEGFA sur VEGFR2 et inhibition sur VEGFR1
Intégrines		αvβ3	Ubiquitaire	- Ancrage cellules endothéliales à la matrice - Réponse optimale à VEGFR2
Ang	Hypoxie Inflammatoires (Ap1, ESE-1) VEGF	Ang1 (1.5Kb, 1.3kb, 0.9 et 0.7)	Ubiquitaire notamment cerveaux et organes génitaux et digestifs	- Maintien de l'intégrité vasculaire
		Ang2	Ovaire, utérus et placenta	- Régulation de l'angiogenèse
		Ang3	Ubiquitaire mais faible	
		Ang4	Foie	
Tie Recepteurs	Hypoxie Inflammation	Tie1		
	Hypoxie	Tie 2	Cellules endothéliales, fibroblastes, neutrophiles et cellules neurales	- Survie cellulaire (PI3kinase, Erk, p38 MAPkinase) - Migration cellulaire (PI3kinase, MAPkinase) - Effet anti-inflammatoires (ABIN2) - Effets anti-

		perméables
Cytokines	CXC ELR+	- Prolifération - Migration - Survie
	CXC ELR-	Inhibition de l'angiogenèse
	TGF-β	- Régulation de l'angiogenèse
FGF	FGF1,2 et4	- Prolifération - Migration cellulaire via FGFR1 et 2
PDGF	PDGFA, B, C et D	- Migration - Prolifération -Stabilisation des vaisseaux via PDGFR
Ephrines	Ephrines A et B	- Mobilité - Régulation des cellules endothéliales (Ras/Gap)

Table 6 : Souris transgénique pour les facteurs angiogéniques
(Ribatti D, 2008 et Olsson Ak 2006)

Facteur		Viabilité	Effets
	vegf-a+/-	Létale E11/12	Défauts dans le développement vasculaire
	vegf-a-/-	Létale E9.5/10.5	Défauts très sévères dans le développement vasculaire
	vegf-a120/120	Létale à la naissance ou PN14	50% des souris meurent après la naissance d'hémorragies dans multiples organes ou à PN14 d'un défaut cardiaque.
	vegf-a164/164	Viable	Aucune anomalie
VEGF	vegf-a188/188	Viable	Défaut de développement de la rétine, nanisme …
	vegf-b-/-	Viable	Hypotrophie cardiaque, dysfonction de la vascularisation coronaire, pas de revascularisation post-ischémique
	VEGF-c surexpression	Viable	Hyperplasie des vaisseaux lymphatiques
	vegf-c-/-	Létale après la naissance	œdème et absence de vaisseaux lymphatiques
	vegf-c+/-	Viable	Œdème lymphatique
	vegf-d-/-	Viable	Développement normal. Hypotrophie des vaisseaux lymphatiques adjacents au foie
	pigf -/-	Viable	Faible angiogenèse post-ischémique, inflammation et cancer
	vegfr1 -/-	Létale E8.5/9.5	Augmentation de l'attachement des hemangioblastes, désorganisation vasculaire due a une surcroissance des cellules endothéliales
VEGFR	vegfr2-/-	Létale E8.5/9.5	Défauts de vasculogenèse
	vegfr3-/-	Létale	Défaut cardiovasculaire et remodelage vasculaire incomplet
	VEGFR3 surexpression	Viable	Inhibition de la lymphogenèse du fœtus , régression des vaisseaux lymphatiques
	nrp1 -/-	Létale	Défaut dans le pattern neural et régression vasculaire
Neuropiline	NRP-1 surexpression	Viable	Défaut cardiovasculaire, malformation cardiaque, excès de vaisseaux, dilatation, hémorragies
	nrp2 -/-	Létale à la naissance (40%)	Nanisme, défaut dans le pattern neural, sévère réduction des vaisseaux lymphatiques et des capillaires
	nrp1- nrp2 -/-	Létale E8.5	Défaut dans le développement vasculaire
	ang1 -/-	Létale E12.5	Vaisseaux immatures absence de cellules péri-vasculaires. Dilatation des vaisseaux.

Angiopoétines	ang1 surexpression au niveau de la peau	Viable	Vascularisation importante. Vaisseaux compacts et stables
	ang2 surexpression	Létale E9.5	Défaut de maturation des vaisseaux comparables à ang1-/-
	tie 1 -/-	Létale	Défaut Cardiovasculaire, œdème et hémorragie
	tie 2 -/-	Létale	Défaut dans le remodelage et la stabilité vasculaire
Fibroblast Growth Factor-2	fgf2 -/-	Viable	Pas de défauts particuliers
	FGF-2 Surexpression	Viable	Réponse amplifiée à l'angiogenèse
Transforming Growth Factore β	tgf-β1 -/-	Létale E10.5	Développement anormal de la vascularisation
	tgfrβ2 -/-	Létale E10.5-11.5	Défaut de vascularisation
Platelet-derived growth factor-B	pdgf-B	Létale après la naissance	Hémorragies et défaut de recrutement de péricytes
	pdgfr-B -/-	Viable	Défaut vascularisation reins
Hypoxia inductible factor 1	hif-1α -/-	Létale	Désorganisation des vaisseaux, dilatation
Cadherine	ve-cadherine -/-	Létale E10	Défaut dans l'interaction cellule-cellule endothéliales
	n-cadherine	Létale E9.5	Défaut de développement du cœur
Ephrines	eph-B2 -/-	Létale E9.5-10.5	Défaut dans le remodelage vasculaire précoce
	eph-B4 -/-	Létale E9.5-10.5	Défaut dans le remodelage vasculaire précoce
Integrines	αv	Létale	Importante angiogenèse et vasculogenèse

BIBLIOGRAPHIE

A

Aberg, M. A., Aberg, N. D., Hedbacker, H., Oscarsson, J. and Eriksson, P. S. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 1529-2401 (Electronic), 2000, 20 (8), 2896-2903

Abbott, N. J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat*, 0021-8782 (Print), 2002, 200 (6), 629-638

Abbott, N. J. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol*, 0272-4340 (Print), 2000, 20 (2), 131-147

Abbott, N. J., Ronnback, L. and Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 1471-003X (Print), 2006, 7 (1), 41-53

Adams, R. H., Wilkinson, G. A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N. W., Deutsch, U., Risau, W. and Klein, R. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev*, 0890-9369 (Print), 1999, 13 (3), 295-306

Adibhatla, R. M. and Hatcher, J. F. Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 1871-5273 (Print), 2008, 7 (3), 243-253

Ahmad, A., Ahmad, S., Chang, L. Y., Schaack, J. and White, C. W. Endothelial Akt activation by hyperoxia: role in cell survival. *Free Radic Biol Med*, 0891-5849 (Print), 2006, 40 (7), 1108-1118

Allt, G. and Lawrenson, J. G. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs*, 1422-6405 (Print), 2001, 169 (1), 1-11

An, P. and Xue, Y. X. Effects of preconditioning on tight junction and cell adhesion of cerebral endothelial cells. *Brain Res*, 1872-6240 (Electronic), 2009

Anderson Per, Morris P, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. The hippocampus book.

Anderson, P., Bliss, T. V. and Skrede, K. K. Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res*, 0014-4819 (Print), 1971, 13 (2), 222-238

Andreeva, A. Y., Krause, E., Muller, E. C., Blasig, I. E. and Utepbergenov, D. I. Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2001, 276 (42), 38480-38486

Angelow, S., Ahlstrom, R. and Yu, A. S. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*, 0363-6127 (Print), 2008, 295 (4), F867-876

Apelt, J., Mehlhorn, G. and Schliebs, R. Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *J Neurosci Res*, 0360-4012 (Print), 1999, 57 (5), 693-705

Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zhang, Y., Zameer, A. and John, G. R. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1091-6490 (Electronic), 2009, 106 (6), 1977-1982

Armstrong, D. L. The hippocampal tissue slice in animal models of CNS disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, 0149-7634 (Print), 1991, 15 (1), 79-83

Auguste, P., Lemiere, S., Larrieu-Lahargue, F. and Bikfalvi, A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1040-8428 (Print), 2005, 54 (1), 53-61

Ay, I., Francis, J. W. and Brown, R. H., Jr. VEGF increases blood-brain barrier permeability to Evans blue dye and tetanus toxin fragment C but not adeno-associated virus in ALS mice. Brain Res, 0006-8993 (Print), 2008, 1234 198-205

B

Baars, C., Loscher, W., Leeb, T., Becker, A. and Potschka, H. Polymorphic variants of the multidrug resistance gene Mdr1a and response to antiepileptic drug treatment in the kindling model of epilepsy. *Eur J Pharmacol*, 0014-2999 (Print), 2006, 550 (1-3), 54-61

Balda, M. S., Anderson, J. M. and Matter, K. The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain. *FEBS Lett*, 0014-5793 (Print), 1996, 399 (3), 326-332

Balda, M. S., Garrett, M. D. and Matter, K. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol*, 0021-9525 (Print), 2003, 160 (3), 423-432

Balda, M. S. and Matter, K. Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol*, 0962-8924 (Print), 2003, 13 (6), 310-318

Balda, M. S. and Matter, K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J*, 0261-4189 (Print), 2000, 19 (9), 2024-2033

Banks, W. A. The CNS as a target for peptides and peptide-based drugs. *Expert Opin Drug Deliv*, 1742-5247 (Print), 2006, 3 (6), 707-712

Baram, T. Z., Gerth, A. and Schultz, L. Febrile seizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies. *Brain Res Dev Brain Res*, 0165-3806 (Print), 1997, 98 (2), 265-270

Bazzoni, G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*, 0955-0674 (Print), 2003, 15 (5), 525-530

Bazzoni, G. and Dejana, E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*, 0031-9333 (Print), 2004, 84 (3), 869-901

Bechmann, I., Goldmann, J., Kovac, A. D., Kwidzinski, E., Simburger, E., Naftolin, F., Dirnagl, U., Nitsch, R. and Priller, J. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J*, 1530-6860 (Electronic), 2005, 19 (6), 647-649

Beck, H. and Plate, K. H. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol*, 1432-0533 (Electronic), 2009, 117 (5), 481-496

Ben-Ari, Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 0306-4522 (Print), 1985, 14 (2), 375-403

Bernacki, J., Dobrowolska, A., Nierwinska, K. and Malecki, A. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep*, 1734-1140 (Print), 2008, 60 (5), 600-622

Bertram, E. The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2007, 48 Suppl 2 65-74

Bethmann, K., Brandt, C. and Loscher, W. Resistance to phenobarbital extends to phenytoin in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2007, 48 (4), 816-826

Bikfalvi, A. Angiogenesis: health and disease. *Ann Oncol*, 0923-7534 (Print), 2006, 17 Suppl 10 x65-70

Binder, D. K., Croll, S. D., Gall, C. M. and Scharfman, H. E. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci*, 0166-2236 (Print), 2001, 24 (1), 47-53

Bogdanovic, E., Nguyen, V. P. and Dumont, D. J. Activation of Tie2 by angiopoietin-1 and angiopoietin-2 results in their release and receptor internalization. *J Cell Sci*, 0021-9533 (Print), 2006, 119 (Pt 17), 3551-3560

Bolwig, T. G., Hertz, M. M. and Westergaard, E. Acute hypertension causing blood-brain barrier breakdown during epileptic seizures. *Acta Neurol Scand*, 0001-6314 (Print), 1977, 56 (4), 335-342

Brandt, C., Glien, M., Potschka, H., Volk, H. and Loscher, W. Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats. *Epilepsy Res*, 0920-1211 (Print), 2003, 55 (1-2), 83-103

Brembeck, F. H., Rosario, M. and Birchmeier, W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*, 0959-437X (Print), 2006, 16 (1), 51-59
Burek, M. and Forster, C. Y. Cloning and characterization of the murine claudin-5 promoter. *Mol Cell Endocrinol*, 0303-7207 (Print), 2009, 298 (1-2), 19-24

Bright, R. and Mochly-Rosen, D. The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury. *Stroke*, 1524-4628 (Electronic), 2005, 36 (12), 2781-2790

Burri, P. H. and Djonov, V. Intussusceptive angiogenesis--the alternative to capillary sprouting. *Mol Aspects Med*, 0098-2997 (Print), 2002, 23 (6S), S1-27

C

Carmeliet, P. and Conway, E. M. Growing better blood vessels. *Nat Biotechnol*, 1087-0156 (Print), 2001, 19 (11), 1019-1020

Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernolle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuyse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., De Ruiter, M. C., Gittenberger-De Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J. M., Collen, D. and Dejana, E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 0092-8674 (Print), 1999, 98 (2), 147-157

Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 1476-4687 (Electronic), 2005, 438 (7070), 932-936

Cattelino, A., Liebner, S., Gallini, R., Zanetti, A., Balconi, G., Corsi, A., Bianco, P., Wolburg, H., Moore, R., Oreda, B., Kemler, R. and Dejana, E. The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol*, 0021-9525 (Print), 2003, 162 (6), 1111-1122

Caveda, L., Martin-Padura, I., Navarro, P., Breviario, F., Corada, M., Gulino, D., Lampugnani, M. G. and Dejana, E. Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest*, 0021-9738 (Print), 1996, 98 (4), 886-893

Cebe-Suarez, S., Zehnder-Fjallman, A. and Ballmer-Hofer, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci*, 1420-682X (Print), 2006, 63 (5), 601-615

Chneiweiss, H. [An astrocytic basis of epilepsy]. *Med Sci (Paris)*, 0767-0974, 2005, 21 (12), 1023-1025

Cohen, R. M., Andreason, P. J. and Sunderland, T. The ratio of mesial to neocortical temporal lobe blood flow as a predictor of dementia. *J Am Geriatr Soc*, 0002-8614 (Print), 1997, 45 (3), 329-333

Cohen, Z., Molinatti, G. and Hamel, E. Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, 0271-678X (Print), 1997, 17 (8), 894-904

Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M. and Miles, R. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science*, 1095-9203 (Electronic), 2002, 298 (5597), 1418-1421

Cordenonsi, M., D'atri, F., Hammar, E., Parry, D. A., Kendrick-Jones, J., Shore, D. and Citi, S. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol*, 0021-9525 (Print), 1999, 147 (7), 1569-1582

Cornford, E. M. and Oldendorf, W. H. Epilepsy and the blood-brain barrier. *Adv Neurol*, 0091-3952 (Print), 1986, 44 787-812

Coubes, P., Awad, I. A., Antar, M., Magdinec, M. and Sufka, B. Comparison and spacial correlation of interictal HMPAO-SPECT and FDG-PET in intractable temporal lobe epilepsy. *Neurol Res*, 0161-6412 (Print), 1993, 15 (3), 160-168

Coultas, L., Chawengsaksophak, K. and Rossant, J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 1476-4687 (Electronic), 2005, 438 (7070), 937-945

Crespel, A., Rigau, V., Coubes, P., Rousset, M. C., De Bock, F., Okano, H., Baldy-Moulinier, M., Bockaert, J. and Lerner-Natoli, M. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, 0969-9961 (Print), 2005, 19 (3), 436-450

Croll, S. D. and Wiegand, S. J. Vascular growth factors in cerebral ischemia. Mol Neurobiol, 0893-7648 (Print), 2001, 23 (2-3), 121-135

Croll, S. D., Ransohoff, R. M., Cai, N., Zhang, Q., Martin, F. J., Wei, T., Kasselman, L. J., Kintner, J., Murphy, A. J., Yancopoulos, G. D. and Wiegand, S. J. VEGF-mediated inflammation precedes angiogenesis in adult brain. *Exp Neurol*, 0014-4886 (Print), 2004, 187 (2), 388-402

Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T. and Claesson-Welsh, L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*, 0968-0004 (Print), 2003, 28 (9), 488-494

Cucullo, L., Hossain, M., Rapp, E., Manders, T., Marchi, N. and Janigro, D. Development of a humanized in vitro blood-brain barrier model to screen for brain penetration of antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2007, 48 (3), 505-516

D

D'atri, F. and Citi, S. Cingulin interacts with F-actin in vitro. *FEBS Lett*, 0014-5793 (Print), 2001, 507 (1), 21-24

Davis, S., Aldrich, T. H., Jones, P. F., Acheson, A., Compton, D. L., Jain, V., Ryan, T. E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P. C. and Yancopoulos, G. D. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 0092-8674 (Print), 1996, 87 (7), 1161-1169

Davis, S., Papadopoulos, N., Aldrich, T. H., Maisonpierre, P. C., Huang, T., Kovac, L., Xu, A., Leidich, R., Radziejewska, E., Rafique, A., Goldberg, J., Jain, V., Bailey, K., Karow, M., Fandl, J., Samuelsson, S. J., Ioffe, E., Rudge, J. S., Daly, T. J., Radziejewski, C. and Yancopoulos, G. D. Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nat Struct Biol*, 1072-8368 (Print), 2003, 10 (1), 38-44

De Bock, F., Dornand, J. and Rondouin, G. Release of TNF alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. *Neuroreport*, 0959-4965 (Print), 1996, 7 (6), 1125-1129

De Paz, P. and Barrio, J. P. Stereological parameters from the analysis of the cell micrographs either by manual point-counting methods or by using a semi-automatic system: a BASIC program for ZX-Spectrum personal computer. *Comput Biol Med*, 0010-4825 (Print), 1985, 15 (3), 153-158

De Simoni, M. G., Perego, C., Ravizza, T., Moneta, D., Conti, M., Marchesi, F., De Luigi, A., Garattini, S. and Vezzani, A. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci*, 0953-816X (Print), 2000, 12 (7), 2623-2633

De Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. and Williams, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 0036-8075 (Print), 1992, 255 (5047), 989-991

Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Larue, B., Guo, H., Wu, Z., Holtzman, D. M. and Zlokovic, B. V. IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor. *J Neurosci*, 1529-2401 (Electronic), 2005, 25 (50), 11495-11503

Dejana, E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1471-0072 (Print), 2004, 5 (4), 261-270

Dejana, E., Bazzoni, G. and Lampugnani, M. G. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res*, 0014-4827 (Print), 1999, 252 (1), 13-19
Dejana, E., Orsenigo, F. and Lampugnani, M. G. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*, 0021-9533 (Print), 2008, 121 (Pt 13), 2115-2122

Del Zoppo, G. J. and Hallenbeck, J. M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res*, 0049-3848 (Print), 2000, 98 (3), 73-81

Del Zoppo, G. J. and Mabuchi, T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 0271-678X (Print), 2003, 23 (8), 879-894

Del Zoppo, G. J., Milner, R., Mabuchi, T., Hung, S., Wang, X. and Koziol, J. A. Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. *Biochem Soc Trans*, 0300-5127 (Print), 2006, 34 (Pt 6), 1261-1266

Demeule, M., Regina, A., Jodoin, J., Laplante, A., Dagenais, C., Berthelet, F., Moghrabi, A. and Beliveau, R. Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol*, 1537-1891 (Print), 2002, 38 (6), 339-348

Dimitrijevic, O. B., Stamatovic, S. M., Keep, R. F. and Andjelkovic, A. V. Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 0271-678X (Print), 2006, 26 (6), 797-810

Discher, D. J., Bishopric, N. H., Wu, X., Peterson, C. A. and Webster, K. A. Hypoxia regulates beta-enolase and pyruvate kinase-M promoters by modulating Sp1/Sp3 binding to a conserved GC element. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 1998, 273 (40), 26087-26093

Djonov, V. G., Kurz, H. and Burri, P. H. Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. *Dev Dyn*, 1058-8388 (Print), 2002, 224 (4), 391-402

Dohgu, S., Takata, F., Yamauchi, A., Nakagawa, S., Egawa, T., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., Niwa, M. and Kataoka, Y. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res*, 0006-8993 (Print), 2005, 1038 (2), 208-215

Dong, H., Fan, Y. H., Zhang, W., Wang, Q., Yang, Q. Z. and Xiong, L. Z. Repeated electroacupuncture preconditioning attenuates matrix metalloproteinase-9 expression and activity after focal cerebral ischemia in rats. *Neurol Res*, 0161-6412 (Print), 2009,

Dore-Duffy, P. and Lamanna, J. C. Physiologic angiodynamics in the brain. *Antioxid Redox Signal*, 1523-0864 (Print), 2007, 9 (9), 1363-1371

Dougher, M. and Terman, B. I. Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene*, 0950-9232 (Print), 1999, 18 (8), 1619-1627

Dube, A., Akbarali, Y., Sato, T. N., Libermann, T. A. and Oettgen, P. Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene. *Circ Res*, 0009-7330 (Print), 1999, 84 (10), 1177-1185

E

Ebnet, K. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem Cell Biol*, 0948-6143 (Print), 2008, 130 (1), 1-20

Ebnet, K., Iden, S., Gerke, V. and Suzuki, A. Regulation of epithelial and endothelial junctions by PAR proteins. *Front Biosci*, 1093-4715 (Electronic), 2008, 13 6520-6536

Eichler, S. A., Kirischuk, S., Juttner, R., Schafermeier, P. K., Legendre, P., Lehmann, T. N., Gloveli, T., Grantyn, R. and Meier, J. C. Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy. *J Cell Mol Med*, 1582-1838 (Print), 2008, 12 (6B), 2848-2866

Eid, T., Lee, T. S., Thomas, M. J., Amiry-Moghaddam, M., Bjornsen, L. P., Spencer, D. D., Agre, P., Ottersen, O. P. and De Lanerolle, N. C. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K+ homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 0027-8424 (Print), 2005, 102 (4), 1193-1198

Eklund, L. and Olsen, B. R. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res*, 0014-4827 (Print), 2006, 312 (5), 630-641

El-Falougy, H. and Benuska, J. History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratisl Lek Listy*, 0006-9248 (Print), 2006, 107 (4), 103-106

Engel, J., Jr. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist*, 1073-8584 (Print), 2001, 7 (4), 340-352

Engel, J., Jr., Berg, A., Andermann, F., Avanzini, G., Berkovic, S., Blume, W., Dulac, O., Van Emde Boas, W., Fejerman, N., Plouin, P., Scheffer, I., Seino, M., Williamson, P. and Wolf, P. Are epilepsy classifications based on epileptic syndromes and seizure types outdated? *Epileptic Disord*, 1294-9361 (Print), 2006, 8 (2), 159-160

Engelhardt, J. I., Soos, J., Obal, I., Vigh, L. and Siklos, L. Subcellular localization of IgG from the sera of ALS patients in the nervous system. *Acta Neurol Scand*, 0001-6314 (Print), 2005, 112 (2), 126-133

Esclapez, M., Hirsch, J. C., Khazipov, R., Ben-Ari, Y. and Bernard, C. Operative GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons in experimental epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 0027-8424 (Print), 1997, 94 (22), 12151-12156

F

Fabene, P. F., Merigo, F., Galie, M., Benati, D., Bernardi, P., Farace, P., Nicolato, E., Marzola, P. and Sbarbati, A. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats involves ischemic and excitotoxic mechanisms. *PLoS ONE*, 1932-6203 (Electronic), 2007, 2 (10), e1105

Fabene, P. F., Navarro, M. G., Martinello, M., Rossi, B., Merigo, F., Ottoboni, L., Bach, S., Angiari, S., Benati, D., Chakir, A., Zanetti, L., Schio, F., Osculati, A., Marzola, P., Nicolato, E., Homeister, J. W., Xia, L., Lowe, J. B., Mcever, R. P., Osculati, F., Sbarbati, A., Butcher, E. C. and Constantin, G. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nat Med*, 1546-170X (Electronic), 2008, 14 (12), 1377-1383

Fabian, R. H. and Petroff, G. Intraneuronal IgG in the central nervous system: uptake by retrograde axonal transport. *Neurology*, 0028-3878 (Print), 1987, 37 (11), 1780-1784

Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A. and Anderson, J. M. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 1998, 273 (45), 29745-29753

Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, 1474-175X (Print), 2002, 2 (10), 795-803

Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 0163-769X (Print), 2004, 25 (4), 581-611

Ferrara, N., Gerber, H. P. and Lecouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 1078-8956 (Print), 2003, 9 (6), 669-676

Ferrara, N., Damico, L., Shams, N., Lowman, H. and Kim, R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina*, 0275-004X (Print), 2006, 26 (8), 859-870

Fiedler, U., Scharpfenecker, M., Koidl, S., Hegen, A., Grunow, V., Schmidt, J. M., Kriz, W., Thurston, G. and Augustin, H. G. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*, 0006-4971 (Print), 2004, 103 (11), 4150-4156

Fiedler, U. and Augustin, H. G. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol*, 1471-4906 (Print), 2006, 27 (12), 552-558

Findley, C. M., Cudmore, M. J., Ahmed, A. and Kontos, C. D. VEGF induces Tie2 shedding via a phosphoinositide 3-kinase/Akt dependent pathway to modulate Tie2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1524-4636 (Electronic), 2007, 27 (12), 2619-2626

Fleegal, M. A., Hom, S., Borg, L. K. and Davis, T. P. Activation of PKC modulates blood-brain barrier endothelial cell permeability changes induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 0363-6135 (Print), 2005, 289 (5), H2012-2019

Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M. and Peng, J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*, 0950-1991 (Print), 1999, 126 (13), 3015-3025

Fuh, G., Garcia, K. C. and De Vos, A. M. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2000, 275 (35), 26690-26695

Fujikawa, D. G. Neuronal death in mesial temporal sclerosis: separating morphology from mechanism. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2003, 44 (12), 1607; author reply 1607-1608

Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S. and Tsukita, S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*, 0021-9525 (Print), 1994, 127 (6 Pt 1), 1617-1626

Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. and Tsukita, S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*, 0021-9525 (Print), 1998, 143 (2), 391-401

G

Galvan, V., Greenberg, D. A. and Jin, K. The role of vascular endothelial growth factor in neurogenesis in adult brain. *Mini Rev Med Chem*, 1389-5575 (Print), 2006, 6 (6), 667-669
Gavard, J. and Gutkind, J. S. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*, 1465-7392 (Print), 2006, 8 (11), 1223-1234

Gavard, J. and Gutkind, J. S. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*, 1465-7392 (Print), 2006, 8 (11), 1223-1234

Gavard, J., Patel, V. and Gutkind, J. S. Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev Cell*, 1534-5807 (Print), 2008, 14 (1), 25-36

Gerber, H. P., Condorelli, F., Park, J. and Ferrara, N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 1997, 272 (38), 23659-23667

Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J. and Sarkadi, B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv*, 1567-2018 (Print), 2004, 1 (1), 27-42

Gloor, S. M., Wachtel, M., Bolliger, M. F., Ishihara, H., Landmann, R. and Frei, K. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001, 36 (2-3), 258-264

Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. and Jaramillo, B. E. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 0079-6107 (Print), 2003, 81 (1), 1-44

Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R. and Chamorro, D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*, 0006-3002 (Print), 2008, 1778 (3), 729-756

Gordon, G. R., Mulligan, S. J. and Macvicar, B. A. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*, 0894-1491 (Print), 2007, 55 (12), 1214-1221

Gorovoy, M., Neamu, R., Niu, J., Vogel, S., Predescu, D., Miyoshi, J., Takai, Y., Kini, V., Mehta, D., Malik, A. B. and Voyno-Yasenetskaya, T. RhoGDI-1 modulation of the activity of monomeric RhoGTPase RhoA regulates endothelial barrier function in mouse lungs. *Circ Res*, 1524-4571 (Electronic), 2007, 101 (1), 50-58

Gorter, J. A., Goncalves Pereira, P. M., Van Vliet, E. A., Aronica, E., Lopes Da Silva, F. H. and Lucassen, P. J. Neuronal cell death in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy is induced by the initial status epilepticus and not by later repeated spontaneous seizures. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2003, 44 (5), 647-658

Gory, S., Vernet, M., Laurent, M., Dejana, E., Dalmon, J. and Huber, P. The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood*, 0006-4971 (Print), 1999, 93 (1), 184-192

Gumbiner, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 0092-8674 (Print), 1996, 84 (3), 345-357

H

Haas, K. Z., Sperber, E. F., Opanashuk, L. A., Stanton, P. K. and Moshe, S. L. Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. *Hippocampus*, 1050-9631 (Print), 2001, 11 (6), 615-625

Hansen, T. M., Moss, A. J. and Brindle, N. P. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and protection following stroke. *Curr Neurovasc Res*, 1875-5739 (Electronic), 2008, 5 (4), 236-245

Harhaj, N. S. and Antonetti, D. A. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol*, 1357-2725 (Print), 2004, 36 (7), 1206-1237

Harfouche, R., Malak, N. A., Brandes, R. P., Karsan, A., Irani, K. and Hussain, S. N. Roles of reactive oxygen species in angiopoietin-1/tie-2 receptor signaling. *FASEB J*, 1530-6860 (Electronic), 2005, 19 (12), 1728-1730

Harper, S. J. and Bates, D. O. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer*, 1474-1768 (Electronic), 2008, 8 (11), 880-887

Harrigan, M. R. Angiogenic factors in the central nervous system. *Neurosurgery*, 0148-396X (Print), 2003, 53 (3), 639-660; discussion 660-631

Hashimoto, T., Wu, Y., Boudreau, N., Li, J., Matsumoto, M. and Young, W. Regulation of tie2 expression by angiopoietin--potential feedback system. *Endothelium*, 1062-3329 (Print), 2004, 11 (3-4), 207-210

Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J. and Stevenson, B. R. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 0021-9525 (Print), 1998, 141 (1), 199-208

Hawkins, R. A., O'kane, R. L., Simpson, I. A. and Vina, J. R. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr*, 0022-3166 (Print), 2006, 136 (1 Suppl), 218S-226S

Hayashi, T., Deguchi, K., Nagotani, S., Zhang, H., Sehara, Y., Tsuchiya, A. and Abe, K. Cerebral ischemia and angiogenesis. *Curr Neurovasc Res*, 1567-2026 (Print), 2006, 3 (2), 119-129

Heinemann, U. Basic mechanisms of partial epilepsies. *Curr Opin Neurol*, 1350-7540 (Print), 2004, 17 (2), 155-159

Hellsten, J., West, M. J., Arvidsson, A., Ekstrand, J., Jansson, L., Wennstrom, M. and Tingstrom, A. Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *Biol Psychiatry*, 0006-3223 (Print), 2005, 58 (11), 871-878

Herve, J. C. The connexins. *Biochim Biophys Acta*, 0006-3002 (Print), 2004, 1662 (1-2), 1-2

Hess, J., Angel, P. and Schorpp-Kistner, M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, 0021-9533 (Print), 2004, 117 (Pt 25), 5965-5973

Hirase, T., Kawashima, S., Wong, E. Y., Ueyama, T., Rikitake, Y., Tsukita, S., Yokoyama, M. and Staddon, J. M. Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by Rhoa-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2001, 276 (13), 10423-10431

Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T. and Shibuya, M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 0027-8424 (Print), 1998, 95 (16), 9349-9354

Hjeresen, D. L., Guy, A. W., Petracca, F. M. and Diaz, J. A microwave-hyperthermia model of febrile convulsions. *Bioelectromagnetics*, 0197-8462 (Print), 1983, 4 (4), 341-355

Ho, E. A. and Piquette-Miller, M. Regulation of multidrug resistance by pro-inflammatory cytokines. *Curr Cancer Drug Targets*, 1568-0096 (Print), 2006, 6 (4), 295-311

Hoffmann, K., Gastens, A. M., Volk, H. A. and Loscher, W. Expression of the multidrug transporter MRP2 in the blood-brain barrier after pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsy Res*, 0920-1211 (Print), 2006, 69 (1), 1-14

Hoffmann, K. and Loscher, W. Upregulation of brain expression of P-glycoprotein in MRP2-deficient TR(-) rats resembles seizure-induced up-regulation of this drug efflux transporter in normal rats. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2007, 48 (4), 631-645

Holinstat, M., Knezevic, N., Broman, M., Samarel, A. M., Malik, A. B. and Mehta, D. Suppression of RhoA activity by focal adhesion kinase-induced activation of p190RhoGAP: role in regulation of endothelial permeability. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2006, 281 (4), 2296-2305

Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M. and Cross, M. J. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, 0898-6568 (Print), 2007, 19 (10), 2003-2012

Holopainen, I. E. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochem Res*, 0364-3190 (Print), 2005, 30 (12), 1521-1528

Holtzman, D., Obana, K. and Olson, J. Hyperthermia-induced seizures in the rat pup: a model for febrile convulsions in children. *Science*, 0036-8075 (Print), 1981, 213 (4511), 1034-1036

Hou, X. Y., Liu, Y. and Zhang, G. Y. PP2, a potent inhibitor of Src family kinases, protects against hippocampal CA1 pyramidal cell death after transient global brain ischemia. *Neurosci Lett*, 0304-3940 (Print), 2007, 420 (3), 235-239

Hruz, P. W. and Mueckler, M. M. Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol*, 0968-7688 (Print), 2001, 18 (3), 183-193

Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. and Bunn, H. F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 0027-8424 (Print), 1998, 95 (14), 7987-7992

Huang, Y., Doherty, J. J. and Dingledine, R. Altered histone acetylation at glutamate receptor 2 and brain-derived neurotrophic factor genes is an early event triggered by status epilepticus. *J Neurosci*, 1529-2401 (Electronic), 2002, 22 (19), 8422-8428

Huang, Y. Q., Li, J. J. and Karpatkin, S. Identification of a family of alternatively spliced mRNA species of angiopoietin-1. *Blood*, 0006-4971 (Print), 2000, 95 (6), 1993-1999

Huber, J. D., Egleton, R. D. and Davis, T. P. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*, 0166-2236 (Print), 2001, 24 (12), 719-725

Hunsberger, J. G., Bennett, A. H., Selvanayagam, E., Duman, R. S. and Newton, S. S. Gene profiling the response to kainic acid induced seizures. *Brain Res Mol Brain Res*, 0169-328X (Print), 2005, 141 (1), 95-112

I

Iadecola, C. and Nedergaard, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*, 1097-6256 (Print), 2007, 10 (11), 1369-1376

Ilbay, G., Sahin, D. and Ates, N. Changes in blood-brain barrier permeability during hot water-induced seizures in rats. *Neurol Sci*, 1590-1874 (Print), 2003, 24 (4), 232-235

Ito, N., Huang, K. and Claesson-Welsh, L. Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins. *Cell Signal*, 0898-6568 (Print), 2001, 13 (11), 849-854

Ito, N., Wernstedt, C., Engstrom, U. and Claesson-Welsh, L. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 1998, 273 (36), 23410-23418

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. and Tsukita, S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*, 0021-9525 (Print), 1999, 147 (6), 1351-1363

Ivanov, D. B., Philippova, M. P. and Tkachuk, V. A. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Mosc)*, 0006-2979 (Print), 2001, 66 (10), 1174-1186

Ivens, S., Kaufer, D., Flores, L. P., Bechmann, I., Zumsteg, D., Tomkins, O., Seiffert, E., Heinemann, U. and Friedman, A. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain*, 1460-2156 (Electronic), 2007, 130 (Pt 2), 535-547

J

Jamali, S., Bartolomei, F., Robaglia-Schlupp, A., Massacrier, A., Peragut, J. C., Regis, J., Dufour, H., Ravid, R., Roll, P., Pereira, S., Royer, B., Roeckel-Trevisiol, N., Fontaine, M., Guye, M., Boucraut, J., Chauvel, P., Cau, P. and Szepetowski, P. Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain*, 1460-2156 (Electronic), 2006, 129 (Pt 3), 625-641

Janigro, D. Blood-brain barrier, ion homeostatis and epilepsy: possible implications towards the understanding of ketogenic diet mechanisms. *Epilepsy Res*, 0920-1211 (Print), 1999, 37 (3), 223-232

Jankowsky, J. L. and Patterson, P. H. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol*, 0301-0082 (Print), 2001, 63 (2), 125-149

Jensen, F. E. and Wang, C. Hypoxia-induced hyperexcitability in vivo and in vitro in the immature hippocampus. *Epilepsy Res*, 0920-1211 (Print), 1996, 26 (1), 131-140

Jeub, M., Beck, H., Siep, E., Ruschenschmidt, C., Speckmann, E. J., Ebert, U., Potschka, H., Freichel, C., Reissmuller, E. and Loscher, W. Effect of phenytoin on sodium and calcium currents in hippocampal CA1 neurons of phenytoin-resistant kindled rats. *Neuropharmacology*, 0028-3908 (Print), 2002, 42 (1), 107-116

Jiang, W., Duong, T. M. and De Lanerolle, N. C. The neuropathology of hyperthermic seizures in the rat. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 1999, 40 (1), 5-19

Jochum, W., Passegue, E. and Wagner, E. F. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*, 0950-9232 (Print), 2001, 20 (19), 2401-2412

Jones, N., Iljin, K., Dumont, D. J. and Alitalo, K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1471-0072 (Print), 2001, 2 (4), 257-267

Josko, J. and Mazurek, M. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit*, 1234-1010 (Print), 2004, 10 (4), RA89-98

Juliano, R. L. The role of drug delivery systems in cancer chemotherapy. *Prog Clin Biol Res*, 0361-7742 (Print), 1976, 9 21-32

K

Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R. and Tjian, R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, 0092-8674 (Print), 1987, 51 (6), 1079-1090

Kaibuchi, K., Kuroda, S., Fukata, M. and Nakagawa, M. Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, 0955-0674 (Print), 1999, 11 (5), 591-596

Karamysheva, A. F. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 0006-2979 (Print), 2008, 73 (7), 751-762

Kash, S. F., Johnson, R. S., Tecott, L. H., Noebels, J. L., Mayfield, R. D., Hanahan, D. and Baekkeskov, S. Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 0027-8424 (Print), 1997, 94 (25), 14060-14065

Kausalya, P. J., Reichert, M. and Hunziker, W. Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS Lett*, 0014-5793 (Print), 2001, 505 (1), 92-96

Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T. and Fujisawa, H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*, 0950-1991 (Print), 1999, 126 (21), 4895-4902

Keeley, E. C., Mehrad, B. and Strieter, R. M. Chemokines as mediators of neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1524-4636 (Electronic), 2008, 28 (11), 1928-1936

Kearney, J. A., Plummer, N. W., Smith, M. R., Kapur, J., Cummins, T. R., Waxman, S. G., Goldin, A. L. and Meisler, M. H. A gain-of-function mutation in the sodium channel gene Scn2a results in seizures and behavioral abnormalities. *Neuroscience*, 0306-4522 (Print), 2001, 102 (2), 307-317

Kilic, E., Kilic, U., Wang, Y., Bassetti, C. L., Marti, H. H. and Hermann, D. M. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB J*, 1530-6860 (Electronic), 2006, 20 (8), 1185-1187

Kim, I., Kim, H. G., So, J. N., Kim, J. H., Kwak, H. J. and Koh, G. Y. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res*, 0009-7330 (Print), 2000, 86 (1), 24-29

Kim, I., Kim, J. H., Ryu, Y. S., Jung, S. H., Nah, J. J. and Koh, G. Y. Characterization and expression of a novel alternatively spliced human angiopoietin-2. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2000, 275 (24), 18550-18556

Kuijper, S., Turner, C. J. and Adams, R. H. Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovasc Med*, 1050-1738 (Print), 2007, 17 (5), 145-151

Koehler, R. C., Roman, R. J. and Harder, D. R. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci*, 0166-2236 (Print), 2009, 32 (3), 160-169

Kokaia, M., Ernfors, P., Kokaia, Z., Elmer, E., Jaenisch, R. and Lindvall, O. Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice. *Exp Neurol*, 0014-4886 (Print), 1995, 133 (2), 215-224

Koss, M., Pfeiffer, G. R., 2nd, Wang, Y., Thomas, S. T., Yerukhimovich, M., Gaarde, W. A., Doerschuk, C. M. and Wang, Q. Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by TNF-alpha and modulate permeability increases in human pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol*, 0022-1767 (Print), 2006, 176 (2), 1218-1227

Kovacs, R., Schuchmann, S., Gabriel, S., Kann, O., Kardos, J. and Heinemann, U. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol*, 0022-3077 (Print), 2002, 88 (6), 2909-2918

Krasilnikov, M. A. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc)*, 0006-2979 (Print), 2000, 65 (1), 59-67

Kubota, H., Ishihara, H., Langmann, T., Schmitz, G., Stieger, B., Wieser, H. G., Yonekawa, Y. and Frei, K. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res*, 0920-1211 (Print), 2006, 68 (3), 213-228

Kubova, H., Mares, P., Suchomelova, L., Brozek, G., Druga, R. and Pitkanen, A. Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *Eur J Neurosci*, 0953-816X (Print), 2004, 19 (12), 3255-3265

Kunz, W. S. The role of mitochondria in epileptogenesis. *Curr Opin Neurol*, 1350-7540 (Print), 2002, 15 (2), 179-184

Kunz, A., Park, L., Abe, T., Gallo, E. F., Anrather, J., Zhou, P. and Iadecola, C. Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *J Neurosci*, 1529-2401 (Electronic), 2007, 27 (27), 7083-7093

L

Ladomery, M. R., Harper, S. J. and Bates, D. O. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett*, 0304-3835 (Print), 2007, 249 (2), 133-142

Lai, C. H. and Kuo, K. H. The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005, 50 (2), 258-265

Lee, S. W., Kim, W. J., Choi, Y. K., Song, H. S., Son, M. J., Gelman, I. H., Kim, Y. J. and Kim, K. W. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med*, 1078-8956 (Print), 2003, 9 (7), 900-906

Lee, S. W., Kim, W. J., Jun, H. O., Choi, Y. K. and Kim, K. W. Angiopoietin-1 reduces vascular endothelial growth factor-induced brain endothelial permeability via upregulation of ZO-2. *Int J Mol Med*, 1107-3756 (Print), 2009, 23 (2), 279-284

Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferre, P. and Penicaud, L. Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res*, 0006-8993 (Print), 1994, 638 (1-2), 221-226

Lerner-Natoli, M., Hashizume, A., Rondouin, G. and Baldy-Moulinier, M. [Wet-dog shaking behavior in rats in hippocampal kindling]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 0037-9026 (Print), 1983, 177 (1), 93-101

Lerner-Natoli, M., De Bock, F., Bockaert, J. and Rondouin, G. NADPH diaphorase-positive cells in the brain after status epilepticus. *Neuroreport*, 0959-4965 (Print), 1994, 5 (18), 2633-2637

Loberg, E. M., Karlsson, B. R. and Torvik, A. Neuronal uptake of plasma proteins after transient cerebral ischemia/hypoxia. Immunohistochemical studies on experimental animals and human brains. *APMIS*, 0903-4641 (Print), 1993, 101 (10), 777-783

Loscher, W., Cramer, S. and Ebert, U. Selection of phenytoin responders and nonresponders in male and female amygdala-kindled Sprague-Dawley rats. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 1998, 39 (11), 1138-1147

Loscher, W. and Potschka, H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx*, 1545-5343 (Print), 2005, 2 (1), 86-98

Loscher, W. and Potschka, H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci*, 1471-003X (Print), 2005, 6 (8), 591-602

Loscher, W. and Potschka, H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol*, 0301-0082 (Print), 2005, 76 (1), 22-76

Lothman, E. W., Bertram, E. H., 3rd and Stringer, J. L. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog Neurobiol*, 0301-0082 (Print), 1991, 37 (1), 1-82

Lukasiuk, K., Kontula, L. and Pitkanen, A. cDNA profiling of epileptogenesis in the rat brain. *Eur J Neurosci*, 0953-816X (Print), 2003, 17 (2), 271-279

Lurton, D., El Bahh, B., Sundstrom, L. and Rougier, A. Granule cell dispersion is correlated with early epileptic events in human temporal lobe epilepsy. *J Neurol Sci*, 0022-510X (Print), 1998, 154 (2), 133-136

M

MacDonald, P. R., Progias, P., Ciani, B., Patel, S., Mayer, U., Steinmetz, M. O. and Kammerer, R. A. Structure of the extracellular domain of Tie receptor tyrosine kinases and localization of the angiopoietin-binding epitope. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2006, 281 (38), 28408-28414

Machein, M. R. and Plate, K. H. VEGF in brain tumors. J Neurooncol, 0167-594X (Print), 2000, 50 (1-2), 109-120

Madsen, C. D. and Sidenius, N. The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signalling. *Eur J Cell Biol*, 0171-9335 (Print), 2008, 87 (8-9), 617-629

Mandell, K. J. and Parkos, C. A. The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev*, 0169-409X (Print), 2005, 57 (6), 857-867

Mahon, P. C., Hirota, K. and Semenza, G. L. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*, 0890-9369 (Print), 2001, 15 (20), 2675-2686

Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., Mcclain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N. and Yancopoulos, G. D. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 0036-8075 (Print), 1997, 277 (5322), 55-60

Makinde, T. and Agrawal, D. K. Intra and extravascular transmembrane signalling of angiopoietin-1-Tie2 receptor in health and disease. *J Cell Mol Med*, 1582-1838 (Print), 2008, 12 (3), 810-828

Makinen, T., Jussila, L., Veikkola, T., Karpanen, T., Kettunen, M. I., Pulkkanen, K. J., Kauppinen, R., Jackson, D. G., Kubo, H., Nishikawa, S., Yla-Herttuala, S. and Alitalo, K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med*, 1078-8956 (Print), 2001, 7 (2), 199-205

Marchi, N., Hallene, K. L., Kight, K. M., Cucullo, L., Moddel, G., Bingaman, W., Dini, G., Vezzani, A. and Janigro, D. Significance of MDR1 and multiple drug resistance in refractory human epileptic brain. *BMC Med*, 1741-7015 (Electronic), 2004, 2 37

Marchi, N., Angelov, L., Masaryk, T., Fazio, V., Granata, T., Hernandez, N., Hallene, K., Diglaw, T., Franic, L., Najm, I. and Janigro, D. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2007, 48 (4), 732-742

Marchi, N., Fan, Q., Ghosh, C., Fazio, V., Bertolini, F., Betto, G., Batra, A., Carlton, E., Najm, I., Granata, T. and Janigro, D. Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol Dis*, 1095-953X (Electronic), 2009, 33 (2), 171-181

Marcon, J., Gagliardi, B., Balosso, S., Maroso, M., Noe, F., Morin, M., Lerner-Natoli, M., Vezzani, A. and Ravizza, T. Age-dependent vascular changes induced by status epilepticus in rat forebrain: implications for epileptogenesis. *Neurobiol Dis*, 1095-953X (Electronic), 2009, 34 (1), 121-132

Master, Z., Jones, N., Tran, J., Jones, J., Kerbel, R. S. and Dumont, D. J. Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *EMBO J*, 0261-4189 (Print), 2001, 20 (21), 5919-5928

Mathern, G. W., Babb, T. L., Pretorius, J. K. and Leite, J. P. Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *J Neurosci*, 0270-6474 (Print), 1995, 15 (5 Pt 2), 3990-4004

Mathern, G. W., Pretorius, J. K., Babb, T. L. and Quinn, B. Unilateral hippocampal mossy fiber sprouting and bilateral asymmetric neuron loss with episodic postictal psychosis. *J Neurosurg*, 0022-3085 (Print), 1995, 82 (2), 228-233

Matsumoto, T. and Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*, 1525-8882 (Electronic), 2001, 2001 (112), RE21

Mcallister, M. S., Krizanac-Bengez, L., Macchia, F., Naftalin, R. J., Pedley, K. C., Mayberg, M. R., Marroni, M., Leaman, S., Stanness, K. A. and Janigro, D. Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Res*, 0006-8993 (Print), 2001, 904 (1), 20-30

Mchugh, J. C. and Delanty, N. Epidemiology and classification of epilepsy: gender comparisons. *Int Rev Neurobiol*, 0074-7742 (Print), 2008, 83 11-26

McColl, B. K., Paavonen, K., Karnezis, T., Harris, N. C., Davydova, N., Rothacker, J., Nice, E. C., Harder, K. W., Roufail, S., Hibbs, M. L., Rogers, P. A., Alitalo, K., Stacker, S. A. and Achen, M. G. Proprotein convertases promote processing of VEGF-D, a critical step for binding the angiogenic receptor VEGFR-2. *FASEB J*, 1530-6860 (Electronic), 2007, 21 (4), 1088-1098

McColl, B. W., Rothwell, N. J. and Allan, S. M. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *J Neurosci*, 1529-2401 (Electronic), 2008, 28 (38), 9451-9462

McCloskey, D. P., Croll, S. D. and Scharfman, H. E. Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. *J Neurosci*, 1529-2401 (Electronic), 2005, 25 (39), 8889-8897

McNamara, J. O. B cells and epilepsy: the odd couple. *Neurology*, 0028-3878 (Print), 2002, 58 (5), 677-678

Mehta, D., Ahmmed, G. U., Paria, B. C., Holinstat, M., Voyno-Yasenetskaya, T., Tiruppathi, C., Minshall, R. D. and Malik, A. B. RhoA interaction with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and transient receptor potential channel-1 regulates Ca2+ entry. Role in signaling increased endothelial permeability. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2003, 278 (35), 33492-33500

Meisler, M. H., Kearney, J., Ottman, R. and Escayg, A. Identification of epilepsy genes in human and mouse. *Annu Rev Genet*, 0066-4197 (Print), 2001, 35 567-588

Meldrum, B. S. and Rogawski, M. A. Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics*, 1933-7213 (Print), 2007, 4 (1), 18-61

Milanini-Mongiat, J., Pouyssegur, J. and Pages, G. Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2002, 277 (23), 20631-20639

Miyamori, H., Takino, T., Kobayashi, Y., Tokai, H., Itoh, Y., Seiki, M. and Sato, H. Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2001, 276 (30), 28204-28211

Montpied, P., De Bock, F., Rondouin, G., Niel, G., Briant, L., Courseau, A. S., Lerner-Natoli, M. and Bockaert, J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res Mol Brain Res*, 0169-328X (Print), 2003, 115 (2), 111-120

Morimoto, K., Fahnestock, M. and Racine, R. J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol*, 0301-0082 (Print), 2004, 73 (1), 1-60

Moser, K. V., Schmidt-Kastner, R., Hinterhuber, H. and Humpel, C. Brain capillaries and cholinergic neurons persist in organotypic brain slices in the absence of blood flow. *Eur J Neurosci*, 0953-816X (Print), 2003, 18 (1), 85-94

Mukhopadhyay, D., Knebelmann, B., Cohen, H. T., Ananth, S. and Sukhatme, V. P. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Mol Cell Biol*, 0270-7306 (Print), 1997, 17 (9), 5629-5639

Muresan, Z., Paul, D. L. and Goodenough, D. A. Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Mol Biol Cell*, 1059-1524 (Print), 2000, 11 (2), 627-634

Murray, B. W., Padrique, E. S., Pinko, C. and Mctigue, M. A. Mechanistic effects of autophosphorylation on receptor tyrosine kinase catalysis: enzymatic characterization of Tie2 and phospho-Tie2. *Biochemistry*, 0006-2960 (Print), 2001, 40 (34), 10243-10253

N

Napione, L., Cascone, I., Mitola, S., Serini, G. and Bussolino, F. Integrins: a flexible platform for endothelial vascular tyrosine kinase receptors. *Autoimmun Rev*, 1568-9972 (Print), 2007, 7 (1), 18-22

Narasimhan, P., Liu, J., Song, Y. S., Massengale, J. L. and Chan, P. H. VEGF Stimulates the ERK 1/2 signaling pathway and apoptosis in cerebral endothelial cells after ischemic conditions. *Stroke*, 1524-4628 (Electronic), 2009, 40 (4), 1467-1473

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 0892-6638 (Print), 1999, 13 (1), 9-22

Neufeld, G., Cohen, T., Shraga, N., Lange, T., Kessler, O. and Herzog, Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 1050-1738 (Print), 2002, 12 (1), 13-19

Newton, S. S., Collier, E. F., Hunsberger, J., Adams, D., Terwilliger, R., Selvanayagam, E. and Duman, R. S. Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors. *J Neurosci*, 1529-2401 (Electronic), 2003, 23 (34), 10841-10851

Newton, S. S., Girgenti, M. J., Collier, E. F. and Duman, R. S. Electroconvulsive seizure increases adult hippocampal angiogenesis in rats. *Eur J Neurosci*, 0953-816X (Print), 2006, 24 (3), 819-828

Nicoletti, J. N., Shah, S. K., Mccloskey, D. P., Goodman, J. H., Elkady, A., Atassi, H., Hylton, D., Rudge, J. S., Scharfman, H. E. and Croll, S. D. Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus. *Neuroscience*, 0306-4522 (Print), 2008, 151 (1), 232-241

Niessen, C. M. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 1523-1747 (Electronic), 2007, 127 (11), 2525-2532

Nishizaki, T., Kammesheidt, A., Sumikawa, K., Asada, T. and Okada, Y. A sodium- and energy-dependent glucose transporter with similarities to SGLT1-2 is expressed in bovine cortical vessels. *Neurosci Res*, 0168-0102 (Print), 1995, 22 (1), 13-22

Niu, X. L., Peters, K. G. and Kontos, C. D. Deletion of the carboxyl terminus of Tie2 enhances kinase activity, signaling, and function. Evidence for an autoinhibitory mechanism. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2002, 277 (35), 31768-31773

Noel, A., Jost, M., Lambert, V., Lecomte, J. and Rakic, J. M. Anti-angiogenic therapy of exudative age-related macular degeneration: current progress and emerging concepts. *Trends Mol Med*, 1471-4914 (Print), 2007, 13 (8), 345-352

Norden, A. D., Drappatz, J. and Wen, P. Y. Antiangiogenic therapy in malignant gliomas. *Curr Opin Oncol*, 1531-703X (Electronic), 2008, 20 (6), 652-661

O

O'donnell, M. E., Lam, T. I., Tran, L. Q., Foroutan, S. and Anderson, S. E. Estradiol reduces activity of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter and decreases edema formation in permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 0271-678X (Print), 2006, 26 (10), 1234-1249

Oby, E. and Janigro, D. The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2006, 47 (11), 1761-1774

Ohsugi, M., Larue, L., Schwarz, H. and Kemler, R. Cell-junctional and cytoskeletal organization in mouse blastocysts lacking E-cadherin. *Dev Biol*, 0012-1606 (Print), 1997, 185 (2), 261-271

Oldendorf, W. H., Cornford, M. E. and Brown, W. J. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol*, 0364-5134 (Print), 1977, 1 (5), 409-417

Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J. and Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1471-0072 (Print), 2006, 7 (5), 359-371

Oommen, K. J., Saba, S., Oommen, J. A., Francel, P. C., Arnold, C. D. and Wilson, D. A. The relative localizing value of interictal and immediate postictal SPECT in seizures of temporal lobe origin. *J Nucl Med*, 0161-5505 (Print), 2004, 45 (12), 2021-2025

Orr, C. F., Rowe, D. B., Mizuno, Y., Mori, H. and Halliday, G. M. A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain*, 1460-2156 (Electronic), 2005, 128 (Pt 11), 2665-2674

Otrock, Z. K., Mahfouz, R. A., Makarem, J. A. and Shamseddine, A. I. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*, 1079-9796 (Print), 2007, 39 (2), 212-220

P

Paemeleire, K. and Leybaert, L. ATP-dependent astrocyte-endothelial calcium signaling following mechanical damage to a single astrocyte in astrocyte-endothelial co-cultures. *J Neurotrauma*, 0897-7151 (Print), 2000, 17 (4), 345-358

Pages, G. and Pouyssegur, J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc Res*, 0008-6363 (Print), 2005, 65 (3), 564-573

Palma, E., Esposito, V., Mileo, A. M., Di Gennaro, G., Quarato, P., Giangaspero, F., Scoppetta, C., Onorati, P., Trettel, F., Miledi, R. and Eusebi, F. Expression of human epileptic temporal lobe neurotransmitter receptors in Xenopus oocytes: An innovative approach to study epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 0027-8424 (Print), 2002, 99 (23), 15078-15083

Palmer, T. D., Willhoite, A. R. and Gage, F. H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*, 0021-9967 (Print), 2000, 425 (4), 479-494

Pardridge, W. M. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol*, 1073-6085 (Print), 2005, 30 (1), 57-70

Parent, J. M., Jessberger, S., Gage, F. H. and Gong, C. Is neurogenesis reparative after status epilepticus? *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2007, 48 Suppl 8 69-71

Paris, L., Tonutti, L., Vannini, C. and Bazzoni, G. Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta*, 0006-3002 (Print), 2008, 1778 (3), 646-659

Patan, S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol*, 0167-594X (Print), 2000, 50 (1-2), 1-15

Pavlovsky, L., Seiffert, E., Heinemann, U., Korn, A., Golan, H. and Friedman, A. Persistent BBB disruption may underlie alpha interferon-induced seizures. *J Neurol*, 0340-5354 (Print), 2005, 252 (1), 42-46

Pellet-Many, C., Frankel, P., Jia, H. and Zachary, I. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J*, 1470-8728 (Electronic), 2008, 411 (2), 211-226

Penn, J. S., Madan, A., Caldwell, R. B., Bartoli, M., Caldwell, R. W. and Hartnett, M. E. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res*, 1350-9462 (Print), 2008, 27 (4), 331-371

Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P. and Attwell, D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 1476-4687 (Electronic), 2006, 443 (7112), 700-704

Perego, C., Vanoni, C., Bossi, M., Massari, S., Basudev, H., Longhi, R. and Pietrini, G. The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. *J Neurochem*, 0022-3042 (Print), 2000, 75 (3), 1076-1084

Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J. and Kanmogne, G. D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1557-1904 (Electronic), 2006, 1 (3), 223-236

Picot, M. C., Baldy-Moulinier, M., Daures, J. P., Dujols, P. and Crespel, A. The prevalence of epilepsy and pharmacoresistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country. *Epilepsia*, 1528-1167 (Electronic), 2008, 49 (7), 1230-1238

Pitkanen, A. and Lukasiuk, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav*, 1525-5069 (Electronic), 2009, 14 Suppl 1 16-25

Pitkanen, A. and Sutula, T. P. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol*, 1474-4422 (Print), 2002, 1 (3), 173-181

Pokutta, S., Drees, F., Takai, Y., Nelson, W. J. and Weis, W. I. Biochemical and structural definition of the l-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2002, 277 (21), 18868-18874

Poncet, S., Gasc, J. M., Janzer, R. C., Meyer, S. and Juillerat-Jeanneret, L. Expression of Tie-2 in human peripheral and autonomic nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 0305-1846 (Print), 2003, 29 (4), 361-369

Potschka, H., Baltes, S. and Loscher, W. Inhibition of multidrug transporters by verapamil or probenecid does not alter blood-brain barrier penetration of levetiracetam in rats. *Epilepsy Res*, 0920-1211 (Print), 2004, 58 (2-3), 85-91

Prosser, H. M., Gill, C. H., Hirst, W. D., Grau, E., Robbins, M., Calver, A., Soffin, E. M., Farmer, C. E., Lanneau, C., Gray, J., Schenck, E., Warmerdam, B. S., Clapham, C., Reavill, C., Rogers, D. C., Stean, T., Upton, N., Humphreys, K., Randall, A., Geppert, M., Davies, C. H. and Pangalos, M. N. Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in GABA(B1)-deficient mice. *Mol Cell Neurosci*, 1044-7431 (Print), 2001, 17 (6), 1059-1070

Q

Qutub, A. A. and Hunt, C. A. Glucose transport to the brain: a systems model. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005, 49 (3), 595-617

R

Racine, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 0013-4694 (Print), 1972, 32 (3), 269-279

Racine, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 0013-4694 (Print), 1972, 32 (3), 281-294
Racine, R., Okujava, V. and Chipashvili, S. Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 0013-4694 (Print), 1972, 32 (3), 295-299

Rajasekaran, A. K., Hojo, M., Huima, T. and Rodriguez-Boulan, E. Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol*, 0021-9525 (Print), 1996, 132 (3), 451-463

Ramirez-Bergeron, D. L., Runge, A., Dahl, K. D., Fehling, H. J., Keller, G. and Simon, M. C. Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development. *Development*, 0950-1991 (Print), 2004, 131 (18), 4623-4634

Ransohoff, R. M. Immunology: Barrier to electrical storms. *Nature*, 1476-4687 (Electronic), 2009, 457 (7226), 155-156

Ravizza, T., Gagliardi, B., Noe, F., Boer, K., Aronica, E. and Vezzani, A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, 0969-9961 (Print), 2008, 29 (1), 142-160

Remler, M. P. and Marcussen, W. H. The blood-brain barrier lesion and the systemic convulsant model of epilepsy. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 1984, 25 (5), 574-577

Reusch, P., Barleon, B., Weindel, K., Martiny-Baron, G., Godde, A., Siemeister, G. and Marme, D. Identification of a soluble form of the angiopoietin receptor TIE-2 released from endothelial cells and present in human blood. *Angiogenesis*, 0969-6970 (Print), 2001, 4 (2), 123-131

Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E. and Artico, M. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anat Rec B New Anat*, 1552-4906 (Print), 2006, 289 (1), 3-8

Richard, D. E., Berra, E. and Pouyssegur, J. Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 0006-291X (Print), 1999, 266 (3), 718-722
Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 0028-0836 (Print), 1997, 386 (6626), 671-674

Ridley, A. J. Rho family proteins and regulation of the actin cytoskeleton. *Prog Mol Subcell Biol*, 0079-6484 (Print), 1999, 22 1-22

Rigau, V., Morin, M., Rousset, M. C., De Bock, F., Lebrun, A., Coubes, P., Picot, M. C., Baldy-Moulinier, M., Bockaert, J., Crespel, A. and Lerner-Natoli, M. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain*, 1460-2156 (Electronic), 2007, 130 (Pt 7), 1942-1956

Roch, C., Leroy, C., Nehlig, A. and Namer, I. J. Predictive value of cortical injury for the development of temporal lobe epilepsy in 21-day-old rats: an MRI approach using the lithium-pilocarpine model. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2002, 43 (10), 1129-1136

Rondouin, G., Bockaert, J. and Lerner-Natoli, M. L-nitroarginine, an inhibitor of NO synthase, dramatically worsens limbic epilepsy in rats. *Neuroreport*, 0959-4965 (Print), 1993, 4 (10), 1187-1190

Roopenian, D. C. and Akilesh, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*, 1474-1741 (Electronic), 2007, 7 (9), 715-725

Rosahl, T. W., Spillane, D., Missler, M., Herz, J., Selig, D. K., Wolff, J. R., Hammer, R. E., Malenka, R. C. and Sudhof, T. C. Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature*, 0028-0836 (Print), 1995, 375 (6531), 488-493

Rosenberg, G. A. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*, 1474-4422 (Print), 2009, 8 (2), 205-216

Roubertie, A., Boukhaddaoui, H., Sieso, V., De Saint-Martin, A., Lellouch-Tubiana, A., Hirsch, E., Echenne, B. and Valmier, J. Antiglial cell autoantibodies and childhood epilepsy: a case report. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2005, 46 (8), 1308-1312

Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H. C., Janatpour, M., Liaw, C. W., Manning, K., Morales, J. and Et Al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol*, 0021-9525 (Print), 1991, 115 (6), 1725-1735

Rucker, H. K., Wynder, H. J. and Thomas, W. E. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull*, 0361-9230 (Print), 2000, 51 (5), 363-369

Rudini, N. and Dejana, E. Adherens junctions. *Curr Biol*, 1879-0445 (Electronic), 2008, 18 (23), R1080-1082

S

Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol*, 0021-9525 (Print), 1998, 141 (2), 397-408

Sandoval, K. E. and Witt, K. A. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis*, 1095-953X (Electronic), 2008, 32 (2), 200-219

Sato, T. N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Takahashi, T. and Kamimura, A. Cyclosporin a promotes hair epithelial cell proliferation and modulates protein kinase C expression and translocation in hair epithelial cells. *J Invest Dermatol*, 0022-202X (Print), 2001, 117 (3), 605-611

Saunders, N. R., Knott, G. W. and Dziegielewska, K. M. Barriers in the immature brain. *Cell Mol Neurobiol*, 0272-4340 (Print), 2000, 20 (1), 29-40

Savettieri, G., Di Liegro, I., Catania, C., Licata, L., Pitarresi, G. L., D'agostino, S., Schiera, G., De Caro, V., Giandalia, G., Giannola, L. I. and Cestelli, A. Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *Neuroreport*, 0959-4965 (Print), 2000, 11 (5), 1081-1084

Scharfman, H. E., Goodman, J. H. and Sollas, A. L. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci*, 0270-6474 (Print), 2000, 20 (16), 6144-6158

Scharfman, H. E. and Hen, R. Neuroscience. Is more neurogenesis always better? *Science*, 1095-9203 (Electronic), 2007, 315 (5810), 336-338

Schauwecker, P. E. Role of genetic influences in animal models of status. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2007, 48 Suppl 8 21-23

Scheppke, L., Aguilar, E., Gariano, R. F., Jacobson, R., Hood, J., Doukas, J., Cao, J., Noronha, G., Yee, S., Weis, S., Martin, M. B., Soll, R., Cheresh, D. A. and Friedlander, M. Retinal vascular permeability suppression by topical application of a novel VEGFR2/Src kinase inhibitor in mice and rabbits. *J Clin Invest*, 0021-9738 (Print), 2008, 118 (6), 2337-2346

Schiera, G., Proia, P., Alberti, C., Mineo, M., Savettieri, G. and Di Liegro, I. Neurons produce FGF2 and VEGF and secrete them at least in part by shedding extracellular vesicles. *J Cell Mol Med*, 1582-1838 (Print), 2007, 11 (6), 1384-1394

Schlachetzki, F., Zhu, C. and Pardridge, W. M. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 0022-3042 (Print), 2002, 81 (1), 203-206

Schneeberger, E. E. and Lynch, R. D. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, 0363-6143 (Print), 2004, 286 (6), C1213-1228

Seiffert, E., Dreier, J. P., Ivens, S., Bechmann, I., Tomkins, O., Heinemann, U. and Friedman, A. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci*, 1529-2401 (Electronic), 2004, 24 (36), 7829-7836

Semenza, G. L. and Wang, G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 0270-7306 (Print), 1992, 12 (12), 5447-5454

Semenza, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*, 8750-7587 (Print), 2000, 88 (4), 1474-1480

Semenza, G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*, 0006-2952 (Print), 2002, 64 (5-6), 993-998

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. and Schuh, A. C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 0028-0836 (Print), 1995, 376 (6535), 62-66

Shapiro, A. B., Fox, K., Lee, P., Yang, Y. D. and Ling, V. Functional intracellular P-glycoprotein. *Int J Cancer*, 0020-7136 (Print), 1998, 76 (6), 857-864

Sharma, A. K., Reams, R. Y., Jordan, W. H., Miller, M. A., Thacker, H. L. and Snyder, P. W. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol*, 0192-6233 (Print), 2007, 35 (7), 984-999

Sheth, P., Basuroy, S., Li, C., Naren, A. P. and Rao, R. K. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2003, 278 (49), 49239-49245

Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep*, 1976-6696 (Print), 2008, 41 (4), 278-286

Shin, K., Fogg, V. C. and Margolis, B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1081-0706 (Print), 2006, 22 207-235

Silverman, A. J., Sutherland, A. K., Wilhelm, M. and Silver, R. Mast cells migrate from blood to brain. *J Neurosci*, 1529-2401 (Electronic), 2000, 20 (1), 401-408

Simard, M. and Nedergaard, M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, 0306-4522 (Print), 2004, 129 (4), 877-896

Simpson, I. A., Carruthers, A. and Vannucci, S. J. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab*, 0271-678X (Print), 2007, 27 (11), 1766-1791

Sims, D. E. Diversity within pericytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 0305-1870 (Print), 2000, 27 (10), 842-846

Singh, H., Milner, C. S., Aguilar Hernandez, M. M., Patel, N. and Brindle, N. P. Vascular endothelial growth factor activates the tie family of receptor tyrosine kinases. *Cell Signal*, 1873-3913 (Electronic), 2009,

Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G. and Klagsbrun, M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 0092-8674 (Print), 1998, 92 (6), 735-745

Sokrab, T. E., Kalimo, H. and Johansson, B. B. Parenchymal changes related to plasma protein extravasation in experimental seizures. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 1990, 31 (1), 1-8

Spengos, K., Tsivgoulis, G. and Zakopoulos, N. Blood pressure management in acute stroke: a long-standing debate. *Eur Neurol*, 0014-3022 (Print), 2006, 55 (3), 123-135

Spyridopoulos, I., Luedemann, C., Chen, D., Kearney, M., Murohara, T., Principe, N., Isner, J. M. and Losordo, D. W. Divergence of angiogenic and vascular permeability signaling by VEGF: inhibition of protein kinase C suppresses VEGF-induced angiogenesis, but promotes VEGF-induced, NO-dependent vascular permeability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1524-4636 (Electronic), 2002, 22 (6), 901-906

Steinhauser, C. and Seifert, G. Glial membrane channels and receptors in epilepsy: impact for generation and spread of seizure activity. *Eur J Pharmacol*, 0014-2999 (Print), 2002, 447 (2-3), 227-237

Stoppini, L., Buchs, P. A. and Muller, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, 0165-0270 (Print), 1991, 37 (2), 173-182

Stringer, S. E. The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. *Biochem Soc Trans*, 0300-5127 (Print), 2006, 34 (Pt 3), 451-453

Sukhai, M. and Piquette-Miller, M. Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals. *J Pharm Pharm Sci*, 1482-1826 (Electronic), 2000, 3 (2), 268-280

Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N. and Yancopoulos, G. D. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 0092-8674 (Print), 1996, 87 (7), 1171-1180

Suske, G. The Sp-family of transcription factors. *Gene*, 0378-1119 (Print), 1999, 238 (2), 291-300

T

Tagaya, M., Haring, H. P., Stuiver, I., Wagner, S., Abumiya, T., Lucero, J., Lee, P., Copeland, B. R., Seiffert, D. and Del Zoppo, G. J. Rapid loss of microvascular integrin expression during focal brain ischemia reflects neuron injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 0271-678X (Print), 2001, 21 (7), 835-846

Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W. and Ogita, H. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1471-0080 (Electronic), 2008, 9 (8), 603-615

Takenaga, Y., Takagi, N., Murotomi, K., Tanonaka, K. and Takeo, S. Inhibition of Src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1559-7016 (Electronic), 2009

Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M. and Wada, K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*, 0036-8075 (Print), 1997, 276 (5319), 1699-1702

Taylor, C. J., Nicola, P. A., Wang, S., Barrand, M. A. and Hladky, S. B. Transporters involved in regulation of intracellular pH in primary cultured rat brain endothelial cells. *J Physiol*, 0022-3751 (Print), 2006, 576 (Pt 3), 769-785

Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D. and Bohlen, P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 0006-291X (Print), 1992, 187 (3), 1579-1586

Tiruppathi, C., Minshall, R. D., Paria, B. C., Vogel, S. M. and Malik, A. B. Role of Ca2+ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*, 1537-1891 (Print), 2002, 39 (4-5), 173-185

Tomkins, O., Shelef, I., Kaizerman, I., Eliushin, A., Afawi, Z., Misk, A., Gidon, M., Cohen, A., Zumsteg, D. and Friedman, A. Blood-brain barrier disruption in post-traumatic epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1468-330X (Electronic), 2008, 79 (7), 774-777

Tong, X. K. and Hamel, E. Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 0306-4522 (Print), 1999, 92 (1), 163-175

Toni Nicolas. Modifications morphologiques associées à la plasticité synaptique sous la direction du Pr Berny J.L et du Pr Muller D. Genève : Faculté de medecine Thèse n° Sc. 3203. Ressources électroniques : http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2000/ToniN/these_front.html

Tontsch, U. and Bauer, H. C. Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res*, 0006-8993 (Print), 1991, 539 (2), 247-253

Traweger, A., Fang, D., Liu, Y. C., Stelzhammer, W., Krizbai, I. A., Fresser, F., Bauer, H. C. and Bauer, H. The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2002, 277 (12), 10201-10208

Traweger, A., Fuchs, R., Krizbai, I. A., Weiger, T. M., Bauer, H. C. and Bauer, H. The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 2003, 278 (4), 2692-2700

Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1471-0072 (Print), 2001, 2 (4), 285-293

Turrin, N. P. and Rivest, S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol Dis*, 0969-9961 (Print), 2004, 16 (2), 321-334

Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Schwarz, M., Czuczwar, S. J., Kleinrok, Z. and Turski, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*, 0166-4328 (Print), 1983, 9 (3), 315-335

U

Uhlmann, E. J., Wong, M., Baldwin, R. L., Bajenaru, M. L., Onda, H., Kwiatkowski, D. J., Yamada, K. and Gutmann, D. H. Astrocyte-specific TSC1 conditional knockout mice exhibit abnormal neuronal organization and seizures. *Ann Neurol*, 0364-5134 (Print), 2002, 52 (3), 285-296

Upton, N. and Stratton, S. Recent developments from genetic mouse models of seizures. *Curr Opin Pharmacol*, 1471-4892 (Print), 2003, 3 (1), 19-26

V

Valable, S., Montaner, J., Bellail, A., Berezowski, V., Brillault, J., Cecchelli, R., Divoux, D., Mackenzie, E. T., Bernaudin, M., Roussel, S. and Petit, E. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1. *J Cereb Blood Flow Metab*, 0271-678X (Print), 2005, 25 (11), 1491-1504

Valenzuela, D. M., Griffiths, J. A., Rojas, J., Aldrich, T. H., Jones, P. F., Zhou, H., Mcclain, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Huang, T., Papadopoulos, N., Maisonpierre, P. C., Davis, S. and Yancopoulos, G. D. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 0027-8424 (Print), 1999, 96 (5), 1904-1909

Van Itallie, C. M. and Anderson, J. M. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*, 0066-4278 (Print), 2006, 68 403-429

Van Vliet, E. A., Da Costa Araujo, S., Redeker, S., Van Schaik, R., Aronica, E. and Gorter, J. A. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*, 1460-2156 (Electronic), 2007, 130 (Pt 2), 521-534

Vandenbroucke, E., Mehta, D., Minshall, R. and Malik, A. B. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci*, 0077-8923 (Print), 2008, 1123 134-145

Vaucher, E., Tong, X. K., Cholet, N., Lantin, S. and Hamel, E. GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow. *J Comp Neurol*, 0021-9967 (Print), 2000, 421 (2), 161-171

Vezzani, A. and Granata, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*, 0013-9580 (Print), 2005, 46 (11), 1724-1743

Vezzani, A. Inflammation and epilepsy. *Epilepsy Curr*, 1535-7597 (Print), 2005, 5 (1), 1-6

Vezzani, A. and Baram, T. Z. New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Curr*, 1535-7597 (Print), 2007, 7 (2), 45-50

Vicedomini, J. P. and Nadler, J. V. A model of status epilepticus based on electrical stimulation of hippocampal afferent pathways. *Exp Neurol*, 0014-4886 (Print), 1987, 96 (3), 681-691

Villeneuve, J., Galarneau, H., Beaudet, M. J., Tremblay, P., Chernomoretz, A. and Vallieres, L. Reduced glioma growth following dexamethasone or anti-angiopoietin 2 treatment. *Brain Pathol*, 1015-6305 (Print), 2008, 18 (3), 401-414

Vogel, C., Bauer, A., Wiesnet, M., Preissner, K. T., Schaper, W., Marti, H. H. and Fischer, S. Flt-1, but not Flk-1 mediates hyperpermeability through activation of the PI3-K/Akt pathway. *J Cell Physiol*, 0021-9541 (Print), 2007, 212 (1), 236-243

Von Tell, D., Armulik, A. and Betsholtz, C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res*, 0014-4827 (Print), 2006, 312 (5), 623-629

W

Wang, H. U., Chen, Z. F. and Anderson, D. J. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*, 0092-8674 (Print), 1998, 93 (5), 741-753

Watson, R., Jiang, Y., Bermudez, I., Houlihan, L., Clover, L., Mcknight, K., Cross, J. H., Hart, I. K., Roubertie, A., Valmier, J., Hart, Y., Palace, J., Beeson, D., Vincent, A. and Lang, B. Absence of antibodies to glutamate receptor type 3 (GluR3) in Rasmussen encephalitis. *Neurology*, 1526-632X (Electronic), 2004, 63 (1), 43-50

Wetherington, J., Serrano, G. and Dingledine, R. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron*, 1097-4199 (Electronic), 2008, 58 (2), 168-178
White, H. S. Animal models of epileptogenesis. *Neurology*, 0028-3878 (Print), 2002, 59 (9 Suppl 5), S7-S14

Whitney, K. D. and Mcnamara, J. O. GluR3 autoantibodies destroy neural cells in a complement-dependent manner modulated by complement regulatory proteins. *J Neurosci*, 1529-2401 (Electronic), 2000, 20 (19), 7307-7316

Wildenberg, G. A., Dohn, M. R., Carnahan, R. H., Davis, M. A., Lobdell, N. A., Settleman, J. and Reynolds, A. B. p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell*, 0092-8674 (Print), 2006, 127 (5), 1027-1039

Willott, E., Balda, M. S., Heintzelman, M., Jameson, B. and Anderson, J. M. Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *Am J Physiol*, 0002-9513 (Print), 1992, 262 (5 Pt 1), C1119-1124

Winawer, M. R., Makarenko, N., Mccloskey, D. P., Hintz, T. M., Nair, N., Palmer, A. A. and Scharfman, H. E. Acute and chronic responses to the convulsant pilocarpine in DBA/2J and A/J mice. *Neuroscience*, 0306-4522 (Print), 2007, 149 (2), 465-475

Witgen, B. M., Lifshitz, J. and Grady, M. S. Inbred mouse strains as a tool to analyze hippocampal neuronal loss after brain injury: a stereological study. *J Neurotrauma*, 0897-7151 (Print), 2006, 23 (9), 1320-1329

Wittchen, E. S., Haskins, J. and Stevenson, B. R. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem*, 0021-9258 (Print), 1999, 274 (49), 35179-35185

Wojciak-Stothard, B. and Ridley, A. J. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*, 1537-1891 (Print), 2002, 39 (4-5), 187-199

Wolburg, H. and Lippoldt, A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*, 1537-1891 (Print), 2002, 38 (6), 323-337

Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K. and Fallier-Becker, P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res*, 1432-0878 (Electronic), 2009, 335 (1), 75-96

Y

Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J. and Holash, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 0028-0836 (Print), 2000, 407 (6801), 242-248

Yu, F., Kamada, H., Niizuma, K., Endo, H. and Chan, P. H. Induction of mmp-9 expression and endothelial injury by oxidative stress after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 0897-7151 (Print), 2008, 25 (3), 184-195

Z

Zhang, F. Y., Chen, X. C., Ren, H. M. and Bao, W. M. Effects of ischemic preconditioning on blood-brain barrier permeability and MMP-9 expression of ischemic brain. *Neurol Res*, 0161-6412 (Print), 2006, 28 (1), 21-24

Zhang, L., Yu, D., Hu, M., Xiong, S., Lang, A., Ellis, L. M. and Pollock, R. E. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res*, 0008-5472 (Print), 2000, 60 (13), 3655-3661

Zhang, Z. and Chopp, M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia. *Trends Cardiovasc Med*, 1050-1738 (Print), 2002, 12 (2), 62-66
Zhu, Y., Lee, C., Shen, F., Du, R., Young, W. L. and Yang, G. Y. Angiopoietin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain. *Stroke*, 1524-4628 (Electronic), 2005, 36 (7), 1533-1537

Zhang, Z. G. and Chopp, M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol*, 1474-4422 (Print), 2009, 8 (5), 491-500
Zhang, Z. and Chopp, M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia. Trends Cardiovasc Med, 1050-1738 (Print), 2002, 12 (2), 62-66

Zhang, Z. G., Zhang, L., Jiang, Q., Zhang, R., Davies, K., Powers, C., Bruggen, N. and Chopp, M. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*, 0021-9738 (Print), 2000, 106 (7), 829-838

Zhao, H., Sapolsky, R. M. and Steinberg, G. K. Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Mol Neurobiol*, 0893-7648 (Print), 2006, 34 (3), 249-270

Zhong, Z., Deane, R., Ali, Z., Parisi, M., Shapovalov, Y., O'banion, M. K., Stojanovic, K., Sagare, A., Boillee, S., Cleveland, D. W. and Zlokovic, B. V. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci*, 1097-6256 (Print), 2008, 11 (4), 420-422

Ziylan, Y. Z. and Ates, N. Age-related changes in regional patterns of blood-brain barrier breakdown during epileptiform seizures induced by pentylenetetrazol. *Neurosci Lett*, 0304-3940 (Print), 1989, 96 (2), 179-184

Zlokovic, B. V., Hyman, S., Mccomb, J. G., Lipovac, M. N., Tang, G. and Davson, H. Kinetics of arginine-vasopressin uptake at the blood-brain barrier. *Biochim Biophys Acta*, 0006-3002 (Print), 1990, 1025 (2), 191-198

Zlokovic, B. V., Yamada, S., Holtzman, D., Ghiso, J. and Frangione, B. Clearance of amyloid beta-peptide from brain: transport or metabolism? *Nat Med*, 1546-170X (Electronic), 2000, 6 (7), 718

Zlokovic, B. V. Remodeling after stroke. *Nat Med*, 1078-8956 (Print), 2006, 12 (4), 390-391

Zlokovic, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 0896-6273 (Print), 2008, 57 (2), 178-201

Zonta, M., Sebelin, A., Gobbo, S., Fellin, T., Pozzan, T. and Carmignoto, G. Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *J Physiol*, 0022-3751 (Print), 2003, 553 (Pt 2), 407-414