



**HAL**  
open science

# Événements moléculaires et cellulaires associés à l'épileptogenèse dans deux modèles murins d'injection intrahippocampique de toxiques. Implication des mécanismes neuro-inflammatoires

Fabien Pernot

► **To cite this version:**

Fabien Pernot. Événements moléculaires et cellulaires associés à l'épileptogenèse dans deux modèles murins d'injection intrahippocampique de toxiques. Implication des mécanismes neuro-inflammatoires. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00441129

**HAL Id: tel-00441129**

**<https://theses.hal.science/tel-00441129>**

Submitted on 14 Dec 2009

**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.



ÉCOLE DOCTORALE INGÉNIERIE POUR LA SANTÉ, LA COGNITION ET  
L'ENVIRONNEMENT Année 2009

Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat

**Monsieur Fabien PERNOT**

**ÉVÉNEMENTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES ASSOCIÉS A  
L'ÉPILEPTOGENÈSE DANS DEUX MODÈLES MURINS D'INJECTION  
INTRAHIPPOCAMPIQUE DE TOXIQUES. IMPLICATION DES MÉCANISMES  
NEURO-INFLAMMATOIRES**

Présentée et soutenue publiquement le 25 novembre 2009 devant un jury composé de :

Mme le Dr. Mireille LERNER-NATOLI	Rapporteur
M. le Dr Laurent BEZIN	Rapporteur
M. le Pr. Alain BUISSON	Président
Mme le Pr. Ilse SMOLDERS	Examineur
M. le Dr. Antoine DEPAULIS	Examineur
M. le Dr. Daniel BÉRACOCHEA	Examineur
M. le Dr. Laurent TAYSSE	Examineur
M. le Pr. Frédéric DORANDEU	Directeur de thèse



# Sommaire

<b>Sommaire</b> .....	<b>i</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>vi</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>vii</b>
<b>Publications/communications</b> .....	<b>x</b>
<b>SECTION A - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I - Épilepsies et mécanismes d'épileptogenèse</b> .....	<b>2</b>
I. Les épilepsies .....	3
II. Les épilepsies partielles du lobe temporal .....	8
III. Les modèles animaux d'épileptogenèse .....	13
IV. Épileptogenèse : hypothèses .....	20
<b>Chapitre II - Transmission cholinergique et épilepsie</b> .....	<b>27</b>
I. Rappels généraux .....	28
II. Acétylcholine et neurodégénérescence .....	33
III. Acétylcholine et neuro-inflammation .....	33
IV. Acétylcholine et épilepsie .....	34
V. Inhibition des cholinestérases : conséquences épileptiques .....	35
<b>Chapitre III - La neuro-inflammation, un lien avec l'épileptogenèse ?</b> .....	<b>41</b>
I. Intervention des cellules immunitaires sanguines .....	42
II. La microglie et les astrocytes : des médiateurs cellulaires de la neuro-inflammation cérébrale .....	44
III. Les médiateurs moléculaires de la neuro-inflammation cérébrale .....	47
<b>Chapitre IV - Questions abordées</b> .....	<b>59</b>
<b>SECTION B - TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX</b> .....	<b>62</b>
<b>Étude I - Potentiel épileptogène de l'injection intrahippocampique de soman chez la souris</b> .....	<b>63</b>
I. Introduction et objectifs .....	64
II. Protocoles d'étude .....	65
III. Résultats .....	75
IV. Éléments de discussion .....	97
<b>Étude II - Réaction neuro-inflammatoire au cours de l'épileptogenèse induite par la micro-injection intrahippocampique de kaïnate chez la souris</b> .....	<b>108</b>
I. Introduction et objectifs .....	109
II. Protocoles d'étude .....	111
III. Résultats .....	117
IV. Éléments de discussion .....	133
<b>Étude III - Stabilité de gènes référents potentiels pour la normalisation des données de RT-qPCR dans le modèle de micro-injection intrahippocampique de kaïnate chez la souris</b> .....	<b>139</b>
I. Introduction et objectifs .....	140
II. Protocoles d'étude .....	141
III. Résultats .....	143
IV. Éléments de discussion .....	149

<b>SECTION C - SYNTHÈSE DES RÉSULTATS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>152</b>
<b>Synthèse.....</b>	<b>153</b>
I. Modèle de micro-injection intrahippocampique de soman chez la souris.....	153
II. Modèle de micro-injection intrahippocampique de KA chez la souris.....	155
III. Normalisation des données de RT-qPCR.....	156
<b>Perspectives.....</b>	<b>157</b>
I. Modèle de micro-injection intrahippocampique de soman chez la souris : perspectives expérimentales...	157
II. Modèle de micro-injection intrahippocampique de KA chez la souris : perspectives expérimentales .....	160
<b>SECTION D - MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>163</b>
<b>Animaux et procédures <i>in vivo</i> .....</b>	<b>164</b>
I. Animaux.....	164
II. Procédure anesthésique.....	164
III. Procédures chirurgicales et induction de l'épileptogenèse.....	165
IV. Implantation des électrodes et suivi électro-encéphalographique.....	168
<b>Procédures <i>ex-vivo</i>.....</b>	<b>171</b>
I. Préparation des tissus frais.....	171
II. Préparation des tissus perfusés.....	173
III. Détections histochimiques.....	174
IV. Détections immunohistochimiques.....	176
V. Déshydratation et montage des lames.....	178
<b>Dosage des ARNm par RT-qPCR.....</b>	<b>179</b>
I. La réaction de transcription inverse.....	179
II. Principe de la réaction d'amplification en temps réel.....	179
III. Conception et optimisation des amorces.....	180
IV. Amplification quantitative des ADNc par PCR.....	181
V. Normalisation des données.....	183
<b>Matériels et méthodes spécifiques à l'étude du soman.....</b>	<b>185</b>
I. Injection du soman sous anesthésie légère.....	185
II. Protection périphérique face aux effets du soman.....	186
III. Prélèvements sanguins et dosage des cholinestérases.....	186
IV. Études comportementales.....	187
V. Analyse morphologique des neurones par la méthode de Golgi.....	193
VI. Détection des cholinestérases sur coupes de cerveau frais congelé.....	194
<b>Matériels et méthodes spécifiques à l'étude du kaïnate.....</b>	<b>195</b>
I. Celecoxib.....	195
II. Lipopolysaccharide bactérien.....	196
<b>Analyse et traitement statistique des données.....</b>	<b>197</b>
I. Dosage des cholinestérases sanguines.....	197
II. Études comportementales.....	197
III. Études EEG.....	197
IV. Études histologiques.....	198
V. Dosage des ARNm par RT-qPCR.....	199
<b>Bibliographie.....</b>	<b>201</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>224</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>226</b>

## *Remerciements*

Je tiens à remercier le bureau MRIS de la DGA pour m'avoir permis d'effectuer ce travail grâce à une bourse de thèse. Cet élément, associé aux infrastructures du département de Toxicologie du CRSSA, m'a permis d'aborder les tâches sereinement.

Je tiens ensuite à remercier Frédéric Dorandeu pour avoir initié ce projet et pour m'avoir fait confiance afin de tenter de l'accomplir. Au cours de ces trois années de recherches doctorales, son implication à mes côtés a été majeure. Sa vision claire du sujet m'a beaucoup aidé à diminuer mes angoisses et son expérience et sa pédagogie furent également des éléments importants, ceux-ci afin de tempérer mes ardeurs. Le fait qu'il me permette d'effectuer d'autres formations, de rencontrer d'autres chercheurs ou de présenter mes travaux devant un public de scientifiques, a été particulièrement important pour moi. Je tiens à le remercier ici pour m'avoir prodigué une formation de qualité.

Je suis particulièrement honoré que Mireille Lerner-Natoli et Laurent Bezin aient accepté d'expertiser ce rapport de thèse. Je tiens à les remercier sincèrement d'avoir apporté leur regard critique sur ces travaux.

Je suis très reconnaissant envers Alain Buisson d'avoir accepté de présider ce jury de thèse ; la présentation des travaux de son équipe au GIN m'avait beaucoup impressionné.

Je tiens à remercier très vivement Antoine Depaulis pour avoir accepté de faire partie du jury. Je voulais saluer ici ses qualités pédagogiques, ainsi que sa disponibilité, qui m'ont permis d'acquérir de solides connaissances de base et ont été très importantes pour moi lors de mon initiation en M2, effectuée en partie dans son laboratoire. Plus tard, avoir apporté son expertise d'épileptologue sur ce travail à des moments clés m'a été d'une aide extrêmement précieuse. Je suis également particulièrement honoré par la présence d'Ilse Smolders, qui vient de Belgique pour juger ce travail. Les travaux de son équipe sur la pilocarpine ont été essentiels pour nous. Merci à Daniel Béracochea d'apporter son regard de comportementaliste ainsi qu'à Laurent Taysse pour avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'expert toxicologue.

Je suis extrêmement reconnaissant envers Pierre Carpentier. Le temps qu'il a passé à la lecture en détails du manuscrit m'a été d'une aide inestimable. Sa traque, d'une grande précision, de mes propos parfois confus ou trop « elliptiques », a été essentielle. Sa passion pour la recherche, très communicative, m'a beaucoup motivé. D'une manière générale, je

tiens à remercier les membres de l'équipe Pharmacologie et Toxicologie Expérimentales qui m'ont considéré comme un collègue à part entière. Parmi eux, Valérie Baille pour son implication et son intérêt pour ce projet : ses connaissances étendues de l'immunohistochimie et sa gentillesse ont été des appuis très importants pour moi. Un grand merci à Guy Testylier pour son apport et sa formation aux phases expérimentales d'EEG. Merci à Annie Foquin : son soin et sa grande rigueur expérimentale ont été particulièrement importants pour mon initiation aux travaux expérimentaux. Merci à Claire Beaup pour l'excellente formation à la RT-qPCR qu'elle m'a donnée. Merci à mon collègue Franck Dhote dont les qualités humaines m'ont permis une intégration rapide au sein du groupe.

Merci à Guy Lallement, ancien directeur du département, pour m'avoir exposé clairement l'intérêt d'initier ce travail. Ceci a joué un grand rôle dans le choix de proposer ma candidature pour ce projet. Son intérêt pour mes choix futurs m'a également beaucoup touché. Merci à Claudine Grosnom pour avoir énormément facilité mes démarches administratives et pour ses attentions toujours bienvenues. Un merci également aux autres membres du département pour avoir participé à l'ambiance chaleureuse qui y règne. J'en profite pour saluer mes différents collègues de bureau et leur souhaiter du courage pour leurs projets.

J'ai grandement apprécié l'esprit cultivé d'André Peinnequin. Sa passion pour les idées neuves me suivra, je l'espère, durant ma vie professionnelle. Merci également à Pascal Pugnière de la plateforme de Biologie Moléculaire du CRSSA pour son soutien précieux durant les phases de biologie moléculaire.

Je tiens à remercier Christophe Piérard, Pierrette Liscia et Mathieu Coutan de l'IMASSA pour leur accueil et leur participation au projet, Daniel Béracochéa de l'Université de Bordeaux ainsi que Pierre Filliat du département de Toxicologie du CRSSA pour les autres études comportementales associées au soman.

Merci à Faustine et à Julie, deux stagiaires très courageuses. J'ai beaucoup appris sur moi grâce à vous deux. Merci à Mélanie, Sandrine, Colin et Benoît de l'équipe épilepsie du GIN pour leur accueil toujours sympathique lors de mes visites.

Merci à mes amis de ne pas m'avoir tenu trop rigueur de mon indisponibilité chronique. Je n'ai pas été souvent à leur côté, ou mal, lors de moments pourtant essentiels. J'ai désormais compris l'importance de certaines choses.

J'exprime toute ma gratitude à ma mère et à mon père. En particulier pour n'avoir jamais critiqué mes choix (mêmes incompréhensibles) et pour m'avoir toujours permis, et incité, à aller plus loin. Merci à vous. Des excuses à ma sœur Charlène et à ses trois enfants que j'ai trop peu vus durant ces trois années. Merci à mon frère Jérôme pour m'avoir indiqué très tôt les chemins à ne pas suivre.

Merci à Anne-Lise de faire partie de ma vie.



## Liste des abréviations

- A**
- AA : acide arachidonique  
 ACh : acétylcholine  
 AChE : acétylcholinestérase  
 AChSH : acétylthiocholine  
 Actb : actine  $\beta$   
 ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire  
 AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate  
 AMPc : adenosine monophosphate cyclique  
 AN : acide nucléique  
 ANOVA : analyse de variance  
 AP : antéropostérieure  
 Arbp : phosphoprotéine ribosomale acide A  
 ARNm : acide ribonucléique messenger  
 ARNr : acide ribonucléique ribosomal  
 AS : alternance spontanée  
 ASC : aire sous la courbe  
 AVC : accident vasculaire cérébral
- B**
- BHE : barrière hémato-encéphalique
- C**
- CA : corne d'Ammon  
 ChE : cholinestérase  
 CNTF : facteur neurotrophique ciliaire  
 COX : cyclo-oxygénase  
 Cq : cycle de quantification  
 CS : stimulus conditionnant (*conditioned stimulus*)  
 CV : coefficient de variation
- D**
- DAB : diaminobenzidine  
 DMSO : diméthylsulfoxyde  
 dNTP : désoxynucléotide triphosphate  
 DS : déviation standard  
 DV : dorsoventral
- E**
- E : efficacité de l'amplification  
 EEG : électro-encéphalographie  
 EMLT : épilepsie de la face mésiale du lobe temporal  
 EPLT : épilepsies partielles du lobe temporal  
 ES : erreur standard
- G**
- GABA : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
 Gapdh : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase  
 GD : gyus denté  
 GFAP : protéine acide des gliofilaments  
 Glu : glutamate  
 Gusb : glucuronidase  $\beta$
- H**
- H&P : hémalun-phloxine  
 Hprt1 : hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1
- I**
- IL : interleukine  
 IL-1RAcP : protéine accessoire du récepteur de l'interleukine-1  
 ILAE : *International League Against Epilepsy*
- J**
- JAK : janus kinase
- K**
- KA : kainate, acide kainique
- L**
- LD : limite de détection  
 LIF : facteur inhibiteur leucémique  
 LPS : lipopolysaccharide
- M**
- M : muscarinique  
 MAPK : protéine kinase activée par des mitogènes  
 MEC : matrice extracellulaire  
 ML : médiolatéral  
 MMP : métalloprotéinase matricielle
- N**
- N : nicotinique  
 NMA : nitrate de méthyl-atropine  
 NMDA : N-méthyl-D-aspartate  
 NOP : neurotoxique organophosphoré  
 NV : groupe de souris naïves
- O**
- OP : composés organophosphorés
- P**
- PB : tampon phosphate  
 PBS : tampon phosphate salin  
 PCR : réaction de polymérisation en chaîne  
 PF : paraformaldéhyde  
 PPI : pour préparation injectable  
 Ppia : Peptidylpropylisomérase A  
 PG : prostaglandine  
 PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>  
 PTZ : pentylènetétrazole
- R**
- RT : réaction de transcription inverse  
 REC : réponse émotionnelle conditionnée  
 Rpm : rotation par minute
- S**
- SE : *status epilepticus*  
 SH : sclérose hippocampique  
 SNC : système nerveux central  
 SOCS: protéine suppressive du signal cytokinique  
 STAT : protéine transductrice du signal et activatrice de transcription
- T**
- TA : température ambiante  
 TBF : temps passé dans le bras fermé  
 TBO : temps passé dans le bras ouvert  
 Tbp : *TATA box binding protein*  
 TBS : tampon Tris salin  
 TC : traumatisme crânien  
 TEM : groupe de souris témoins  
 TNF $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale  $\alpha$
- U**
- US : stimulus non conditionnant (*unconditioned stimulus*)

## *Introduction générale*

L'épilepsie est une atteinte neurologique liée à un dysfonctionnement cérébral caractérisé par une hypersynchronie chronique de certains réseaux neuronaux. Des atteintes modifiant l'intégrité du fonctionnement physiologique cérébral comme les traumatismes crâniens (TC) par exemple, sont capables, après une période correspondant à l'épileptogenèse, d'induire des crises épileptiques spontanées et récurrentes chez l'homme. Les épilepsies partielles du lobe temporal (EPLT) sont une forme très fréquente d'épilepsie chez l'homme adulte. En particulier, le syndrome d'épilepsie de la face mésiale du lobe temporal (EMLT) est souvent associé à un événement précipitant durant la petite enfance comme l'occurrence de crises fébriles ou d'un épisode de *status epilepticus* (SE). L'hippocampe est particulièrement apte à la synchronisation neuronale et est fortement impliqué dans les processus de mémorisation. Le développement de l'EMLT est associé à des remaniements structuraux importants de cette structure, culminant en une sclérose hippocampique (SH). L'hippocampe est une structure très excitable et particulièrement vulnérable en raison du nombre des récepteurs au glutamate (Glu), comme le démontrent certains modèles animaux d'EMLT utilisant l'injection intrahippocampique de kaïnate (KA, un agoniste des récepteurs glutamatergiques).

De nombreuses études soulignent le rôle de l'inflammation cérébrale dans certaines pathologies chroniques, dont l'épilepsie. En particulier, de nouvelles avancées semblent indiquer un rôle grandissant des mécanismes neuro-inflammatoires dans les premières étapes du processus d'épileptogenèse, notamment dans l'EMLT. La production de facteurs inflammatoires comme les cytokines peuvent théoriquement exacerber les dommages neuronaux et influencer le processus épileptique.

L'acétylcholine (ACh) est un autre neuromédiateur majeur du cerveau où il est impliqué dans les fonctions de cognition et de mémorisation. Il est également bien établi que

l'activation cholinergique peut induire des phénomènes épileptiques. En effet, l'injection périphérique ou intrahippocampique de pilocarpine (un agoniste des récepteurs cholinergiques muscariniques) chez le rat est un modèle très utilisé d'EPLT. Les inhibiteurs de cholinestérase (ChE) sont également susceptibles d'entraîner des convulsions et un SE, des variations du taux cérébral de Glu extracellulaire ainsi que des modifications morphologiques de l'hippocampe ressemblant aux atteintes observées chez les patients épileptiques et les modèles animaux d'EPLT. Néanmoins, les études des conséquences épileptogènes d'une hypercholinergie liée à l'administration systémique ou intrahippocampique d'inhibiteurs des ChE sont rares. En particulier, la possibilité qu'une hypercholinergie endogène, limitée à l'hippocampe, puisse déclencher un mécanisme d'épileptogenèse n'a jamais été explorée. **Le premier objectif de ce travail était donc de déterminer si une inhibition des ChE hippocampiques par le soman, un toxique de guerre, aboutissant à une augmentation de la concentration en ACh au sein de l'hippocampe, est un événement déclencheur de mécanismes neuro-inflammatoires et du processus d'épileptogenèse chez la souris.** Nous avons au cours de cette étude cherché à caractériser les événements électro-encéphalographiques (EEG), cellulaires et moléculaires ainsi que les conséquences comportementales à long terme de cette atteinte.

**Notre second objectif était de caractériser les événements cellulaires et moléculaires en lien avec la neuro-inflammation dans un modèle animal d'EMLT provoqué par l'injection intrahippocampique de KA chez la souris.** Au cours de cette étude, nous avons cherché à décrire les manifestations neuro-inflammatoires en lien avec le développement des décharges hippocampiques. Un second volet a consisté à moduler la réponse neuro-inflammatoire et à observer l'évolution du processus d'épileptogenèse ainsi que les conséquences sur le développement de la SH.

Parmi les méthodologies employées au cours de ces travaux, la technique quantitative de transcription inverse suivie de la polymérisation en chaîne par extension d'amorces (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) a été particulièrement utilisée pour l'étude des altérations d'expression génique de cytokines et d'autres molécules liées aux phénomènes neuro-inflammatoires. Cette méthode très sensible nécessite quelques précautions afin d'obtenir des résultats fiables. En particulier, une normalisation des données brutes est requise pour contrôler les erreurs associées aux étapes pré-analytiques. L'utilisation d'étalons internes, constitués par des *gènes de référence*, est actuellement la méthode de normalisation la plus répandue. Cependant, cette stratégie ne dispense pas de s'assurer au préalable de l'absence de régulation des gènes utilisés dans le contexte expérimental donné. Cette condition n'est quasiment jamais respectée au cours des études de neurobiologie, et ce, particulièrement dans le domaine de l'épilepsie. **Le troisième objectif de ce travail était donc d'étudier la stabilité de gènes de référence potentiels au cours du mécanisme d'épileptogenèse.**

Le présent travail comprend trois sections. Après une section A consacrée à une introduction bibliographique des concepts utilisés et du cadre scientifique, les travaux expérimentaux ont été présentés dans une section B développant chacun des trois objectifs précédemment décrits. La section C regroupe les descriptions des techniques utilisées pour les travaux expérimentaux.

## ***Publications/communications***

Ce travail a été financé par le Ministère Français de la Défense : bourse de Doctorat (DGA/D4S/MRIS, F. Pernot) et contrats d'objectifs 03CO011-05 et 08CO0502 (DGA/DSP/STTC-SH, F. Dorandeu).

### **Articles publiés dans des revues à comité de lecture**

F. Pernot, P. Carpentier, V. Baille, G. Testylier, C. Beaup, A. Foquin, P. Filliat, P. Liscia, M. Coutan, C. Piérard, D. Béracochéa and F. Dorandeu (2009). *Intrahippocampal cholinesterase inhibition induces epileptogenesis in mice without evidence of neurodegenerative events. Neuroscience 162(4):1351-1365.*

F. Pernot, F. Dorandeu, C. Beaup and A. Peinnequin (2009). *Selection of reference genes for real-time reverse transcription-polymerase chain reaction in hippocampal structure in a murine model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. Journal of Neuroscience Research, in press.*

### **Articles soumis dans des revues à comité de lecture**

F. Pernot, A. Peinnequin, P. Carpentier, G. Testylier, V. Baille, C. Beaup, A. Foquin, A. Depaulis and F. Dorandeu (2009). *Differential neuroinflammatory response in the hippocampal structure during epileptogenesis in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy. Submitted in Neurobiology of Disease.*

### **Communication orale**

F. Pernot (2008). *Principales caractéristiques d'un nouveau modèle murin d'épileptogénèse sans claires atteintes cellulaires initiales : micro-injection intrahippocampique de soman, 3<sup>ème</sup> Biennale de la recherche du Service de Santé des Armées, École du Val-de-Grâce, Paris, 11/06/08.*

### **Communications affichées**

F. Pernot, P. Carpentier, V. Baille, G. Testylier, C. Delacour, A. Foquin et F. Dorandeu (2009). *Mécanismes d'épileptogénèse dans deux modèles murins de micro-injection intrahippocampique de toxiques et importance de la stratégie de normalisation dans les études de RT-qPCR, Rencontres Innovation DGA 2009, Cité des Sciences, Paris, 14/05/09.*

F. Pernot, P. Carpentier, V. Baille, G. Testylier, C. Delacour, A. Foquin, A. Depaulis and F. Dorandeu (2008). *Neuro-inflammation et épileptogénèse, Doctoriales<sup>®</sup> DGA/Ecole Polytechnique, Fréjus, 21-27/09/08.*

F. Pernot, P. Carpentier, V. Baille, G. Testylier, C. Delacour, A. Foquin, A. Depaulis and F. Dorandeu (2008). *Differential neuroinflammatory response in the hippocampal structure during epileptogenesis in a mouse model of MTLE, 6<sup>th</sup> FENS Forum, Genève, 14/07/08.*

F. Pernot, P. Carpentier, V. Baille, G. Testylier, C. Delacour, A. Foquin and F. Dorandeu (2008). *A new murine model of epileptogenesis without clear initial cell damage: intrahippocampal micro-injection of soman. A preliminary report, 16<sup>th</sup> Bioscience Medical Defense Review, Hunt Valley, U.S.A., 1-6/06/08.*

F. Pernot, P. Carpentier, V. Baille, G. Testylier, C. Delacour, A. Foquin, A. Depaulis et F. Dorandeu (2008). *Réponse neuro-inflammatoire hippocampique durant l'épileptogénèse dans un modèle murin d'épilepsie mésio-temporale, Congrès de la Société de Physiopathologie Neurovasculaire, Paris, 12/01/08.*

*- Section A -*

*Introduction bibliographique*

---

# **Chapitre I**

## **Épilepsies et mécanismes d'épileptogénèse**

## I. Les épilepsies

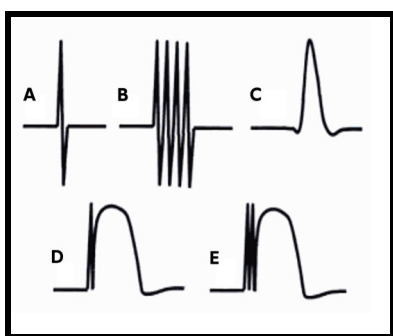
### I.1. Aspects généraux de la maladie épileptique

L'épilepsie est une affection neurologique chronique qui affecte près de 1 % de la population mondiale, avec des conséquences sociales et économiques préoccupantes ([http://www.who.int/mental\\_health/management/en/GcaeBroEn.pdf](http://www.who.int/mental_health/management/en/GcaeBroEn.pdf)). Cette atteinte hétérogène est caractérisée par la répétition d'événements spontanés interrompant le fonctionnement cérébral physiologique : les crises épileptiques, traduisant une activité excessive anormale et synchronisée d'un réseau de neurones cérébraux, et caractérisées par l'apparition transitoire d'un certain nombre de symptômes (convulsions, perte de conscience, etc.).

Le diagnostic d'épilepsie repose majoritairement sur les données EEG. En effet, associé aux données cliniques, l'enregistrement des potentiels cérébraux recueillis sur le scalp demeure un examen diagnostique, de prise en charge et de surveillance du traitement indispensable en épileptologie clinique. L'activité rythmique est une propriété fondamentale des neurones et son organisation physiologique est liée à la synchronisation d'oscillations à travers les réseaux neuronaux, localement ou sur des territoires cérébraux plus ou moins étendus. L'activité EEG physiologique est ainsi constituée d'ondes de périodes relativement constantes permettant de définir des bandes de fréquence ou rythmes EEG :  $\delta$ , delta (0,5-4 Hz) ;  $\theta$ , thêta (4-8 Hz) ;  $\alpha$ , alpha (8-14 Hz) ;  $\beta$ , bêta (14-30 Hz) et  $\gamma$ , gamma (30-100 Hz). Le rythme  $\alpha$  est le plus courant chez l'adulte (Vibert et coll., 2005). Les composants oscillatoires enregistrés sur l'EEG se sont vus attribuer des rôles dans des processus cérébraux variés comme la cognition, la perception et l'action. En simplifiant, les activités lentes sont associées au sommeil et les oscillations plus rapides à l'état de vigilance.



En épileptologie clinique, on distingue sur une base morphologique plusieurs types d'anomalies EEG élémentaires (Figure 1). Le terme paroxystique appliqué à ces activités pathologiques traduit un début et une fin brutale avec un maximum d'amplitude rapidement atteint. De ce fait, ces grapho-éléments se détachent nettement des rythmes fondamentaux du tracé et peuvent s'organiser de manière rythmique, selon des modalités diverses, dans l'intervalle des crises (anomalies interictales) ou pendant la crise épileptique (anomalies ictales).



**Figure 1. Activités paroxystiques élémentaires**

On distingue plusieurs types de paroxysmes EEG en fonction de leur durée : (A), la *pointe diphasique*, de brève durée (20 à 70 ms) ; (B), les *polypointes*, succession de deux ou plusieurs pointes ; (C), la *pointe lente*, d'une durée comprise entre 70 et 200 ms ; (D), la *pointe-onde*, pointe suivie d'une onde lente de même polarité et (E), les *polypointes-onde*, polypointes suivies immédiatement d'une onde lente. D'après Vibert et coll. (2005).

### *La crise épileptique*

La crise épileptique est provoquée par l'hypersynchronisation et l'hyperactivation paroxystique d'un réseau de neurones cérébraux. La sémiologie clinique des crises épileptiques dépend de l'origine topographique et de la propagation des décharges neuronales. Les crises épileptiques sont ainsi caractérisées par leur mode d'initiation et de résolution, les manifestations cliniques associées et le mode de propagation de la synchronisation neuronale. Ces caractéristiques ont permis une standardisation de la classification et de la terminologie des différents types de crises par la ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE, <http://www.ilae-epilepsy.org> ; Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981), aboutissant à une distinction principale entre crises partielles et crises généralisées (Tableau 1).

**Tableau 1. Classification des crises épileptiques, d'après *The Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1981)***

<p><b>1. Crises partielles</b></p> <p><b>1.1. Crises partielles simples (sans altération de la conscience)</b></p> <p>1.1.1. Motrices</p> <p>1.1.2. Sensitivo-sensorielles</p> <p>1.1.3. Végétatives</p> <p>1.1.4. Psychiques</p> <p><b>1.2. Crises partielles complexes (avec altération de la conscience)</b></p> <p>1.2.1. Crises partielles simples évoluant vers une altération de la conscience</p> <p>1.2.2. Altération initiale de la conscience sans automatismes moteurs</p> <p>1.2.3. Altération initiale de la conscience avec automatismes moteurs</p> <p><b>1.3. Crises partielles secondairement généralisées</b></p> <p>1.3.1. Crises partielles simples secondairement généralisées</p> <p>1.3.2. Crises partielles complexes secondairement généralisées</p> <p>1.3.3. Crises partielles simples évoluant vers des crises partielles complexes puis vers la généralisation</p> <p><b>2. Crises généralisées</b></p> <p><b>2.1. Absences</b></p> <p>2.1.1. Absences typiques</p> <p>2.1.2. Absences atypiques</p> <p><b>2.2. Crises myocloniques</b></p> <p><b>2.3. Crises cloniques</b></p> <p><b>2.4. Crises toniques</b></p> <p><b>2.5. Crises tonico-cloniques</b></p> <p><b>2.6. Crises atoniques</b></p> <p><b>3. Crises non classées</b></p>
--

### *Le status epilepticus*

Le SE a été initialement défini comme une crise épileptique non contrôlée qui persiste assez longtemps, ou qui est répétée assez fréquemment, pour ne pas permettre de récupération entre les attaques. La durée de 30 min a d'abord été considérée comme un minimum (Proceedings of the American Epilepsy Society Course, 1993). Une définition plus opérationnelle a réduit la durée seuil à 5 min (Lowenstein et coll., 1999) afin de permettre une prise en charge rapide des patients en raison de la morbidité associée à cet état clinique (Chen et Wasterlain, 2006). Une classification sémiologique a été récemment proposée en se basant principalement sur le type de fonction cérébrale affectée, les manifestations cliniques associées et l'évolution dans le temps (Rona et coll., 2005).

### *Les syndromes épileptiques*

Une crise unique, pouvant être déclenchée par une affection aiguë (toxique, métabolique, infectieuse, traumatique, etc.), ne constitue pas une authentique épilepsie. En effet, l'épilepsie est caractérisée par une prédisposition persistante à générer des crises épileptiques spontanées. L'épilepsie est donc caractérisée par deux événements dynamiques :

- **l'ictogénèse**, un processus créant un état de décharge neuronale soutenue et synchronisée d'une population de neurones cérébraux et permettant le passage de l'état intercritique vers la crise ;
- **l'épileptogénèse**, un processus qui regroupe l'ensemble des événements permettant la mise en place d'un état chronique caractérisé par la récurrence de crises spontanées et aboutissant à la transformation du « cerveau sain » en « cerveau épileptique ».

Le caractère hétérogène des différents syndromes épileptiques est clairement mis en évidence par la diversité des conséquences neurobiologiques, cognitives, sociales et psychologiques propres à cette condition (Fisher et coll., 2005). Cette diversité

physiopathologique a conduit à une classification des différents syndromes, intégrant non seulement les types de crises, mais aussi l'état neurologique et cognitif, les antécédents personnels et familiaux, les données paracliniques parmi lesquelles l'EEG (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989). Ces données permettent une distinction entre épilepsies généralisées, épilepsies focales, épilepsies dont le caractère focal ou généralisé n'est pas déterminé, et enfin les syndromes particuliers.

Cette hétérogénéité sémiologique révèle une diversité étiologique. Les différents syndromes épileptiques ont ainsi été subdivisés étiologiquement en épilepsies idiopathiques et épilepsies symptomatiques. Les épilepsies idiopathiques sont définies comme des atteintes n'ayant pas d'autre cause sous-jacente qu'une prédisposition héréditaire. En revanche, les épilepsies symptomatiques sont caractérisées par une atteinte cérébrale, acquise ou clairement identifiable, considérée comme la cause de la maladie (Kahane et coll., 2002). Lorsque les épilepsies sont présumées symptomatiques mais que l'étiologie précise n'a pas encore été identifiée, on parle alors d'épilepsies « probablement symptomatiques » (Engel, 2001).

## **I.2. Facteurs de risques chez l'adulte**

De nombreux facteurs de risques du développement de la maladie épileptique ont été identifiés. Les mieux décrits incluent le TC, les infections du SNC, la maladie d'Alzheimer, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les crises fébriles. D'autres facteurs de risques existent mais possèdent une plus faible prévalence, comme la consommation d'alcools et de psychotropes, le syndrome d'hyperactivité et de déficit de l'attention, la sclérose en plaque ou le syndrome démentiel de la personne âgée.

Le type d'événement précipitant peut influencer le type de crises susceptibles de se développer. Plus particulièrement, il semble exister une association entre l'occurrence de

crises fébriles durant l'enfance, le développement d'une atrophie mésio-temporale ou sclérose hippocampique, et la récurrence de crises temporales partielles (Cendes, 2004).

## **II. Les épilepsies partielles du lobe temporal**

### **II.1. Généralités**

Les EPLT font partie des formes les plus fréquemment diagnostiquées chez l'adulte. Elles se manifestent par un état chronique d'hyperexcitabilité et d'hypersynchronie neuronales aboutissant à des crises partielles récurrentes spontanées avec ou sans généralisation secondaire. Actuellement, les EPLT peuvent être subdivisées en deux groupes : (i) le syndrome d'épilepsie de la face mésiale du lobe temporal (EMLT), la forme la plus fréquente d'EPLT, avec une génération des crises au sein des structures mésio-temporales dont l'hippocampe et (ii) les autres syndromes dont les crises prennent origine à un autre endroit du lobe temporal (néocortex ou structures latérales) (Williamson et Engel, 2008). Du point de vue étiologique, le syndrome d'EMLT est en association étroite avec un historique de convulsions fébriles, mais peut également être associé à d'autres atteintes cérébrales initiales comme un TC ou une infection intracérébrale post-natale (Engel et coll., 2008). Une période de latence sans crise, ou épiléptogénèse, entre l'événement initiateur et le début du syndrome épiléptique, est une caractéristique majeure du processus physiopathologique. Cette période de latence peut durer plusieurs années. La compréhension des mécanismes physiopathologiques de ce syndrome est d'une importance majeure. En effet, près de 90 % des EMLT deviennent pharmaco-résistantes (Wieser, 2004). Les traitements pharmacologiques, même lorsqu'ils sont efficaces, agissent, pour la majorité d'entre eux, sur les mécanismes d'ictogénèse, sans intervention sur le processus d'épiléptogénèse ni sur la récurrence des crises. Le traitement chirurgical curatif, qui consiste en la résection des structures temporales internes impliquées dans la genèse des crises, devient la principale

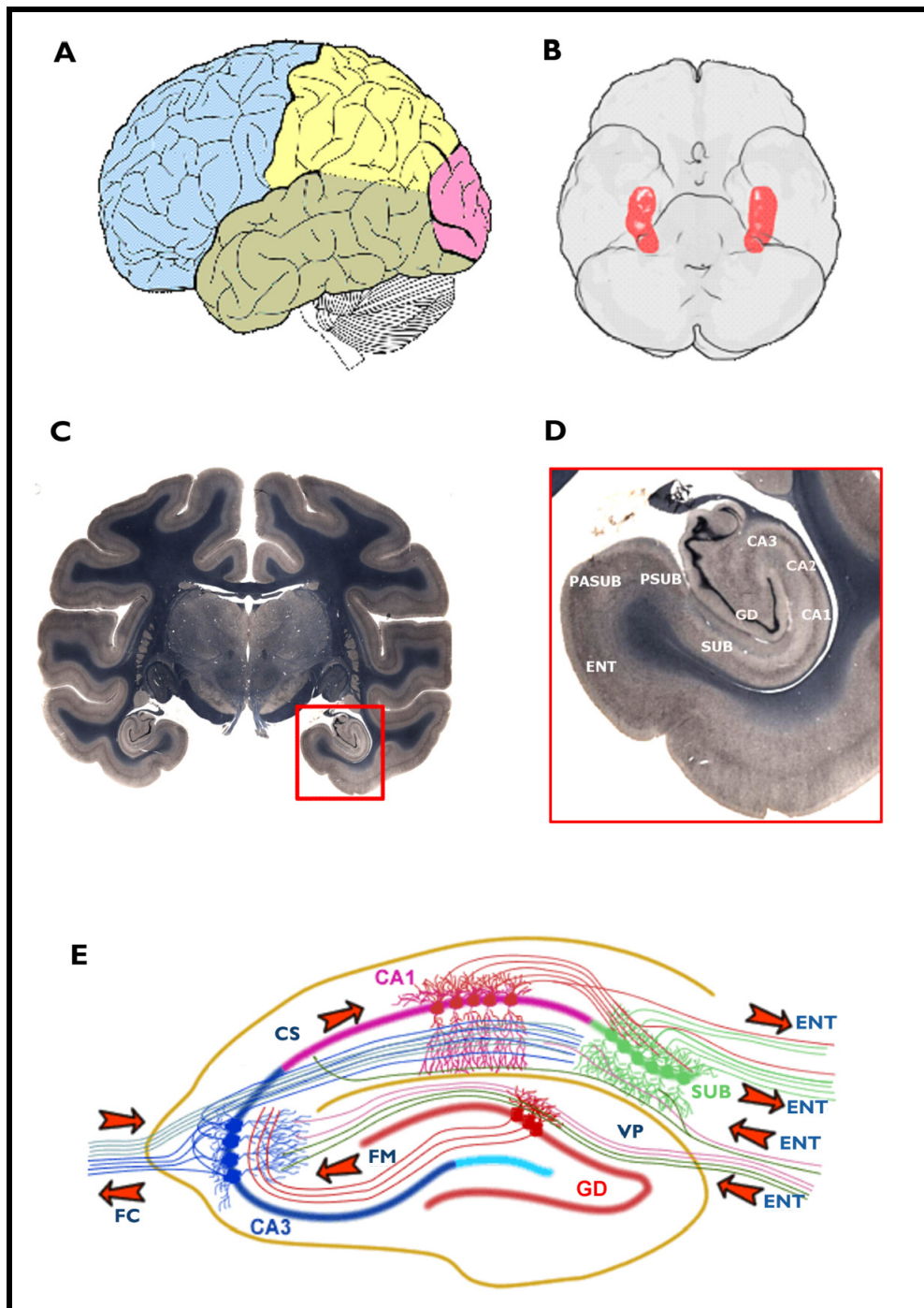
solution thérapeutique chez certains patients après un bilan exploratoire localisateur. La compréhension des mécanismes associés à ce syndrome pourraient ouvrir d'autres voies d'interventions thérapeutiques.

Les techniques d'imagerie ainsi qu'une analyse histologique des tissus de résection des patients atteints d'EMLT détectent, dans près de 70 % des cas, une atrophie unilatérale de l'hippocampe (Engel et coll., 2008). Ces données et un faisceau concordant d'études exploratoires ou curatives démontrent un rôle majeur de la structure hippocampique dans la physiopathologie du syndrome d'EMLT (Semah et coll., 1998; Sloviter, 2005). Parce que l'excision unilatérale de l'hippocampe diminue effectivement la fréquence des crises (Spencer, 2002) et parce que les lésions sont majoritairement confinées à l'hippocampe, cette structure est considérée comme étant le siège de la génération des crises.

## **II.2. Neuro-anatomie hippocampique**

Chez les mammifères supérieurs, l'hippocampe est une petite structure allongée, bilatérale, symétrique, sous-corticale du SNC, enroulée sur elle-même et occupant la partie interne de la face médiane du lobe temporal (Figure 2A, B). Il constitue avec l'amygdale, le septum et le thalamus, l'un des éléments principaux du système limbique. Ce dernier joue un rôle important dans les processus émotionnels, d'apprentissage et de mémorisation.

Figure 2. Situation anatomique et cyto-architecture de l'hippocampe



(A), vue latérale du cerveau humain et délimitation des lobes principaux : le lobe temporal est indiqué en vert. (B), localisation de l'hippocampe, en rouge, au sein du cerveau humain en vue ventrale. (C), coupe frontale d'un cerveau de *Macaca mulatta* en coloration de Weil (Mikula et coll., 2006). La structure hippocampique, cadre rouge, est agrandie (D) et permet la visualisation des différentes couches cellulaires. (E), relais synaptique au sein de l'hippocampe : les afférences du cortex entorhinal (ENT) contactent le gyrus denté (GD) et CA3 par la voie perforante (VP) ; les axones des cellules granulaires du GD, les fibres moussues (FM), innervent également la région CA3 ; les collatérales des cellules pyramidales de CA3, les collatérales de Schaffer (CS), innervent les cellules pyramidales de CA1 ainsi que l'hippocampe controlatéral par les fibres commissurales (FC) ; finalement les cellules de CA1 et CA3 innervent la région du subiculum (SUB) en direction du cortex entorhinal. Figure originale consultable à l'adresse <http://www.bristol.ac.uk/Depts/Synaptic/info/pathway/hippocampal.htm>. Autres abréviations : CA, corne d'Ammon ; PSUB, présubiculum ; PASUB, parasubiculum.

L'hippocampe est formé de deux couches neuronales interconnectées en forme de U inversé, le gyrus denté (GD) et la corne d'Ammon (CA) (Figure 2C, D), subdivisée elle-même en trois régions (CA1, CA2 et CA3).

### ***II.2.1. La voie polysynaptique intrahippocampique***

Du point de vue cytologique, le GD est constitué des corps cellulaires des neurones granulaires. Les axones de ces neurones forment les fibres moussues qui contactent les dendrites apicales des cellules pyramidales en CA3. Le GD est également caractérisé par la présence de cellules souches neuronales au niveau de la zone sous-granulaire. Les neurones pyramidaux sont les cellules principales de la CA. À l'extrémité de CA3, le hile est constitué de neurones polymorphes et de cellules moussues qui émettent des projections ipsilatérales et commissurales vers le GD. L'hippocampe est caractérisé par une boucle anatomique permettant un flux unidirectionnel depuis le cortex entorhinal (*via* la voie perforante) vers les cellules granulaires du GD, les cellules pyramidales de la CA (CA3 *via* les fibres moussues puis CA1 *via* les collatérales de Schaffer) vers le subiculum, qui est sa principale efférence, relié anatomiquement au cortex entorhinal (Figure 2E). Cette boucle polysynaptique est organisée selon l'axe transversal. La structure tridimensionnelle de l'hippocampe est constituée de la juxtaposition de ces unités organisationnelles, reliées entre elles selon l'axe longitudinal (Pallud, 2005). En plus des projections vers l'hippocampe controlatéral (fibres commissurales) et le subiculum, une autre voie efférente de l'hippocampe est le fornix. Cet important réseau de fibres projette vers différentes structures du SNC comme la formation réticulée, le septum, le noyau accumbens et l'aire pré-optique.

### ***II.2.2. Neurochimie hippocampique***

Le flux unidirectionnel à travers l'hippocampe est transporté par des connexions excitatrices utilisant le Glu comme neurotransmetteur. Celui-ci active principalement trois



types de récepteurs responsables de la transmission excitatrice ionotrope par activation de canaux sodiques et calciques : (i) N-méthyl-D-aspartate (NMDA) ; (ii)  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA) et (iii) kaïnate (KA). Les récepteurs NMDA et AMPA sont très majoritairement responsables de l'activité excitatrice du Glu au sein de l'hippocampe, où ils sont colocalisés au niveau des synapses des cellules granulaires du GD et des cellules pyramidales de la CA. Les récepteurs KA ont, quant à eux, un rôle moins bien défini dans la transmission synaptique hippocampique ; ils sont localisés majoritairement au niveau des synapses des fibres moussues sur les cellules pyramidales de CA3 (Osten et coll., 2007).

L'activité hippocampique excitatrice est régulée par des interneurons qui représentent environ 10 % du contingent neuronal. Ceux-ci utilisent principalement l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur et occupent des positions distinctes au sein des microcircuits hippocampiques. Au niveau des aires CA1, CA3 et du GD, des interneurons GABAergiques particuliers, les cellules à corbeille, forment un réseau dense autour des corps cellulaires des cellules pyramidales et granulaires, exerçant un contrôle inhibiteur de l'excitabilité de ces cellules. Un second niveau de régulation provient des afférences de l'hippocampe. Les afférences cholinergiques et GABAergiques en provenance du septum jouent un rôle majeur dans la synchronisation neuronale hippocampique, notamment dans la genèse des rythmes  $\theta$ , par une activation directe des cellules principales ou des interneurons hippocampiques. Des afférences catécholaminergiques, en provenance des noyaux du raphé et du *locus caeruleus*, innervent les cellules pyramidales et granulaires hippocampiques. Leur rôle reste à définir plus précisément.

La prédominance de fibres excitatrices glutamatergiques, et la facilité avec laquelle cette excitation peut être potentialisée dans cette structure, rend l'hippocampe particulièrement vulnérable à l'activité épileptique.

### **II.3. Caractérisation de la sclérose hippocampique**

L'association entre la maladie épileptique et la SH a été notée dès le 19<sup>ème</sup> siècle (Bouchet et Cazauvielh, 1825). La SH est caractérisée par une atrophie unilatérale de la structure hippocampique, associée à une perte cellulaire sélective, touchant principalement les cellules pyramidales des couches CA1 et CA3, ainsi que les cellules moussues du hile (Crespel et coll., 2002; de Lanerolle et coll., 2003; Thom et coll., 2005). Une dispersion des cellules granulaires du GD et un bourgeonnement de leurs axones sont également observés dans la plupart des cas (Mathern et coll., 1997; Sloviter, 2005). La SH est également caractérisée par une activation massive des cellules astrocytaires, qui deviennent alors majoritaires au sein de l'hippocampe sclérosé et forment une cicatrice gliale massive.

L'étude de la physiopathologie de cette atteinte et des facteurs d'épileptogénèse n'est pas aisée chez l'homme. Le développement de modèles animaux pertinents permet ainsi d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires du processus d'épileptogénèse ainsi que leurs interactions dynamiques aboutissant à la maladie épileptique.

### **III. Les modèles animaux d'épileptogénèse**

La plupart des modèles animaux développés tentent de modéliser le syndrome d'EMLT en raison de sa fréquence chez l'homme adulte. Comme signalé précédemment, les principales caractéristiques de l'EMLT sont : (i) une localisation du foyer critique au sein du système limbique, spécialement dans l'hippocampe, le cortex entorhinal ou l'amygdale (Bartolomei et coll., 2005) ; (ii) l'association fréquente à un événement initial précipitant la pathogénèse de

la maladie ; (iii) un intervalle de latence clinique ou épileptogène, sans crise, après cet événement initial ; (iv) une forte incidence de l'atteinte sclérotique de l'hippocampe.

### **III.1. Modèles développés par similitude étiologique avec l'épilepsie humaine**

L'ensemble des modèles élaborés reproduisant une hyperthermie néonatale, un TC (Golarai et coll., 2001; Lowenstein et coll., 1992) ou une ischémie post-natale (Karhunen et coll., 2003) chez l'animal ne permet pas, dans la majorité des cas, de modéliser de façon satisfaisante l'ensemble des caractéristiques de l'EMLT : soit en raison de l'absence de crises récurrentes à l'âge adulte (Dube et coll., 2000), soit de différences dans la localisation du foyer épileptique (D'Ambrosio et coll., 2005) ou de l'inconstance des lésions observées (Karhunen et coll., 2007; Williams et coll., 2004).

### **III.2. Modèles d'embrassement**

Le processus d'embrassement induit des crises épileptiques par la répétition de faibles stimulations électriques ou pharmacologiques du cerveau. L'embrassement est effectué en stimulant différentes régions cérébrales pendant plusieurs jours ou semaines afin d'induire des crises puissantes chez l'animal. Bien que le pentylènetétrazole (PTZ) et la bicuculline, deux antagonistes du récepteur GABA<sub>A</sub>, ainsi que le carbachol, un agoniste cholinergique, soient utilisés (Gilbert et Goodman, 2006), la stimulation électrique reste la technique privilégiée pour induire ce phénomène, en permettant la stimulation de sites neuro-anatomiques précis (McIntyre, 2006).

Des différences notables avec le syndrome humain ont été révélées comme la généralisation quasi-constante en crises motrices secondaires puissantes après la répétition des stimulations électriques et l'inconstance de crises spontanées (McIntyre et coll., 2002). Ces différences sont probablement en lien avec la corticalisation du cerveau humain. De plus,

ces modèles induisent des modifications neuro-anatomiques variables et peu comparables au syndrome d'EMLT humain (Bertram, 2007).

### **III.3. Modèles post-SE**

Ces modèles sont communément basés sur un événement initiateur provoquant un SE et ce, de diverses manières, notamment par administration systémique ou micro-injection intracérébrale de convulsivants chimiques (pilocarpine, KA) ou par stimulation électrique focale et prolongée d'une structure limbique. Dans tous ces modèles, les animaux récupèrent après la période initiale de SE et, après une période de latence de quelques jours ou quelques semaines, développent des crises spontanées et récurrentes qui dureront toute leur vie. Il faut cependant noter que chez les rongeurs, la réponse à ces traitements épileptogènes est très dépendante de l'âge. Ainsi, les animaux immatures, comparés aux adultes, semblent plus susceptibles de développer un SE sans pour autant développer de lésions hippocampiques sévères, ou de réorganisations synaptiques importantes (Cavalheiro et coll., 2006; Zhao et Holmes, 2006).

#### ***III.3.1. Induction par stimulation électrique***

La stimulation électrique continue de structures limbiques comme l'amygdale, le cortex piriforme ou l'hippocampe permet le déclenchement d'un SE chez l'animal. La stimulation électrique de la voie perforante, la principale afférence hippocampique (Figure 2E), est le protocole le plus utilisé. Un modèle pertinent d'EMLT a ainsi été décrit où les lésions histopathologiques sont restreintes à l'hippocampe (Sloviter, 1991). Ce modèle est souvent considéré comme un modèle « pur » en raison de l'absence d'administration de substances pharmacologiques comme dans les autres modèles post-SE décrits dans les parties suivantes (Kienzler et coll., 2009).

### ***III.3.2. Induction par stimulation pharmacologique***

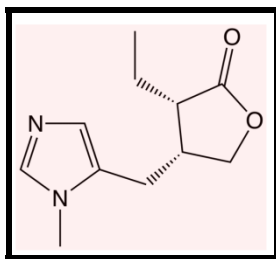
Le KA et la pilocarpine sont les deux agents pharmacologiques les plus couramment utilisés pour induire un SE chez l'animal en vue de reproduire le syndrome d'EMLT.

#### ***a. Pilocarpine et agents cholinergiques***

La pilocarpine (Figure 3) est un agoniste des récepteurs muscariniques à l'ACh. Notamment en combinaison avec le lithium (Muller et coll., 2009), elle reproduit la plupart des aspects cliniques et morphologiques de l'EMLT, comme la présence de crises spontanées, observées après une période de latence électroclinique, durant toute la vie de l'animal. Sur le plan histologique, la perte cellulaire n'est pas limitée aux structures limbiques, avec une nécrose neuronale de régions du néocortex et du cortex olfactif, de l'amygdale, du thalamus et de la substance noire (Cavalheiro et coll., 2006). Les cellules granulaires du GD sont également le siège de lésions. La forte mortalité induite par l'hypercholinergie massive est un inconvénient majeur de ce modèle et l'adjonction de traitements pharmacologiques visant à réduire les effets cholinergiques périphériques et la sévérité du SE est souvent nécessaire.

L'administration intracérébrale de carbachol et de bétanecol, deux analogues non hydrolysables de l'ACh, ont été utilisés par le passé pour induire un SE chez l'animal (Baker et Benedict, 1968; Turski et coll., 1983b; Wasterlain et Jonec, 1980). L'administration intraventriculaire ou intrahippocampique de pilocarpine est de même capable d'induire un SE chez l'animal (Cavalheiro et coll., 2006). De plus, l'injection directe de pilocarpine dans l'hippocampe permet, comme avec le modèle d'intoxication systémique, d'induire des crises récurrentes post-SE chez le rat et de modéliser le syndrome d'EMLT (Furtado et coll., 2002).

**Figure 3. Structure chimique de la pilocarpine**



### ***b. Le kainate***

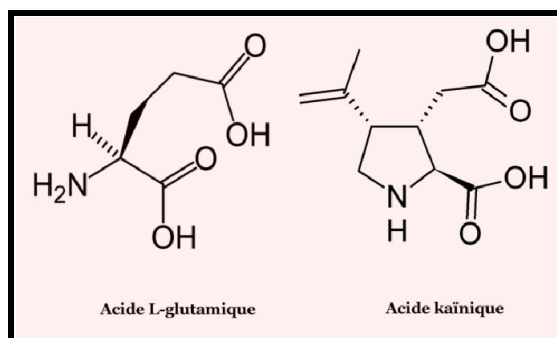
Le KA (acide (2-carboxy-4-isopropényl-3-pyrrolidiny)-acétique) est un analogue cyclique du L-glutamate (Figure 4) initialement isolé d'une algue rouge japonaise (*Digenea simplex*). C'est un agoniste puissant et sélectif des récepteurs glutamatergiques, en activant préférentiellement les récepteurs non-NMDA (AMPA et KA ; Vincent et Mulle, 2009). Le modèle KA est similaire au modèle pilocarpine dans le sens où une période de latence post-SE précédant un état chronique de récurrence de crises spontanées est également induite. Le KA peut être administré par voie systémique (ip, iv) ou par voie intracérébrale, avec des différences notables dans les caractéristiques physiopathologiques de l'état épileptique.

#### **i. Induction par voie systémique**

Lorsque le KA est administré par voie systémique (ip) chez l'animal, l'induction du SE évolue toujours vers des crises limbiques récurrentes et spontanées, mais comme dans le modèle pilocarpine, un traitement pharmacologique anticonvulsif est nécessaire afin de réduire la mortalité. Cependant, chez les animaux développant une épilepsie chronique, la plupart des caractéristiques neuropathologiques sont comparables aux changements observés dans l'EMLT avec une perte sélective des champs hippocampiques CA1 et CA3 et du hile. La zone CA3 est préférentiellement endommagée par rapport à la zone CA1, ce qui reflète la plus forte distribution des récepteurs KA hippocampiques dans cette zone (Vincent et Mulle, 2009). En revanche, dans le cas de la SH humaine, CA1 est généralement plus endommagée que CA3 (Dudek et coll., 2006). Des événements neurodégénératifs sont également détectés

dans des structures extrahippocampiques, notamment les cortex piriforme et olfactif, l'amygdale, le septum, certains noyaux thalamiques et certaines zones du néocortex (Ben-Ari et Cossart, 2000). Les altérations neuropathologiques induites par l'injection systémique de KA (comme celles produites par la pilocarpine) sont donc moins localisées que celles rapportées dans les tissus de patients atteints d'EMLT (Sloviter, 2008).

**Figure 4. Structure chimique de l'acide kaïnique**



## ii. Induction par voie intrahippocampique

Les effets neurophysiologiques de la micro-injection de KA dans l'hippocampe dorsal de souris ont été récemment caractérisés (Bouilleret et coll., 1999; Riban et coll., 2002). Ce modèle induit une phase initiale de SE non convulsif, suivie par une période d'épileptogénèse. À l'issue, et de façon progressive, apparaissent des activités rythmiques à type de pointes, d'abord isolées, qui s'organisent ensuite en bouffées et en décharges de haute fréquence. Elles sont limitées à l'hippocampe injecté et durent toute la vie de l'animal. Les décharges paroxystiques hippocampiques observées sont résistantes à la phénytoïne, au valproate et à la carbamazépine, mais supprimées par l'utilisation de diazépam (Riban et coll., 2002). Cette pharmacorésistance à certaines molécules anti-épileptiques classiques est en accord avec celle observée chez des patients atteints d'EMLT associée à une SH (Riban et coll., 2002). Deux semaines après l'injection intrahippocampique de KA, une dégénérescence complète des aires CA1 et CA3 est observée. Parallèlement, un élargissement (dispersion) de

la couche des cellules granulaires du GD débute et atteint son extension maximale un mois après l'injection.

Les différentes caractéristiques cliniques, EEG, histopathologiques et pharmacologiques font de ce mode d'injection un modèle de choix pour l'étude des caractéristiques physiopathologiques de l'EMLT. En effet, les séquelles histopathologiques ressemblent à celle de la SH décrite dans l'EMLT humaine : atteinte cellulaire au niveau du hile, grande vulnérabilité de la couche pyramidale de CA1, dispersion des cellules granulaires du GD, bourgeonnement des fibres mossues hippocampiques. De plus, l'absence de dommages neuronaux dans des aires distantes de l'hippocampe permet à ce modèle de se rapprocher encore des caractéristiques de l'EMLT. Enfin, ce modèle a l'avantage de préserver l'unilatéralité des lésions et des décharges EEG (à l'exception de la phase initiale) fréquemment observée chez les patients. De manière plus pratique, la voie intrahippocampique présente l'intérêt de réduire le taux de mortalité et d'éviter l'adjonction de traitements pharmacologiques visant à limiter ou stopper le SE initial, ou à corriger les effets délétères périphériques des molécules pharmacologiques induisant le SE (Dudek et coll., 2006).

Ce modèle, permettant une modélisation pertinente de l'EMLT, a été à la base des travaux expérimentaux présentés dans la section B et focalisés sur la période d'épileptogénèse, période de latence électroclinique, particulièrement reproductible dans ce modèle (14 à 21 j). Il nous a permis l'étude des phénomènes neuro-inflammatoires associés (Expérimentation II, page 108) et celle de la régulation de gènes de référence pour la normalisation des données de RT-qPCR au cours de l'épileptogénèse (Expérimentation III, page 139). Il faut cependant noter que la pertinence de ce modèle, malgré ses apports dans la compréhension de la physiopathologie (voir *infra*), a été récemment discutée ; une certaine indépendance entre les mécanismes qui conduisent à l'épileptogénèse et ceux qui mènent à certains effets



neuropathologiques, telle que la dispersion des cellules granulaires du GD a été ainsi mis en évidence (Kienzler et coll., 2009).

#### **IV. Épileptogenèse : hypothèses**

Le phénomène d'épileptogenèse comprend probablement une cascade d'événements aboutissant à l'occurrence de crises épileptiques spontanées (Depaulis, 2001 ; Pitkänen et coll., 2007). Nous citerons les principales hypothèses actuelles.

##### **IV.1. Perte neuronale sélective**

Les modifications histologiques les mieux décrites durant le processus d'épileptogenèse, à la fois chez les patients et dans les modèles expérimentaux, sont la neurodégénérescence et la perte cellulaire sélective qui a lieu dans le hile et la couche pyramidale hippocampique. Cependant, l'épileptogenèse ne semble pas être liée directement à l'existence de processus neurodégénératifs, mais à des modifications cérébrales fonctionnelles dont la nature exacte reste encore inconnue. En effet, la protection des neurones hippocampiques après le SE ne prévient pas forcément le processus d'épileptogenèse (Brandt et coll., 2003), et les conséquences neurologiques post-SE semblent dissociées des atteintes neuronales intrinsèques (McKay et Persinger, 2004). La neurodégénérescence n'est pas, en effet, un pré-requis à l'épileptogenèse comme démontré dans le cerveau immature (Holmes, 2002). De plus, il semble difficile de concevoir, *a priori*, comment la perte neuronale peut contribuer à un état d'hyperexcitabilité. Cependant, quand elle existe, cette perte neuronale sélective stimule la réorganisation des circuits hippocampiques. L'existence de nouveaux contacts, formés au cours du processus d'épileptogenèse, pourrait expliquer en partie l'hyperexcitabilité récurrente de l'hippocampe.

## **IV.2. Réorganisation synaptique**

Dans l'hippocampe « épileptique » humain, ainsi que dans certains modèles animaux d'EMLT, les cellules granulaires du GD sont souvent dispersées et un bourgeonnement de leurs axones (les fibres moussues) est constaté, probablement en lien avec la perte des cibles neuronales. Ce bourgeonnement, rendu visible par une coloration sensible au zinc (coloration de Timm) ou par détection immunohistochimique d'un transporteur au zinc (ZnT<sub>3</sub>), forme de nouvelles connexions au niveau infrapyramidal de la couche CA3. De plus, un bourgeonnement rétrograde des fibres moussues par extension de collatérales additionnelles vient innervier les dendrites apicales des cellules granulaires, aboutissant à des néoconnexions supragranulaires au niveau du GD, formant un circuit fonctionnel excitateur récurrent. Il a été démontré dans de nombreux modèles expérimentaux que des agressions épileptogènes comme le SE, le TC et l'AVC induisent un bourgeonnement de ces prolongements axonaux (Pitkänen et coll., 2007). Les études expérimentales suggèrent que ce bourgeonnement survient avant l'apparition des crises spontanées et est maintenu durant la vie de l'animal épileptique (Sutula et Dudek, 2007). D'autres secteurs de l'hippocampe, comme le champ CA1, sont également le siège de ce type d'atteinte. Ces réorganisations synaptiques confèreraient au GD en particulier une excitabilité accrue et donc un rôle potentiel dans l'initiation et/ou l'entretien des crises épileptiques. Cependant, il existe quelques exemples où cette forme de plasticité pathologique en réponse aux processus neurodégénératifs dans l'hippocampe n'est pas présente ou n'a pas de rôle critique dans le processus d'épileptogénèse (Longo et Mello, 1998 ; Mohapel et coll., 2000).

La réorganisation du circuit hippocampique touche également les interneurons et une hypothèse spécifique concerne la désinhibition des cellules à corbeille (voir page 12). Ces interneurons, bien que toujours présents, sont désafférentés par la réorganisation du tissu et la perte cellulaire, et deviendraient inactifs, ce qui rendrait l'hippocampe hyperexcitable

(Bekenstein et Lothman, 1993; Sloviter, 1991). Certaines études ne soutiennent cependant pas cette hypothèse en démontrant que les interneurons qui survivent dans le tissu épileptique font preuve d'une plasticité importante (Bernard et coll., 1998 ; Depaulis, 2001; Esclapez et coll., 1997).

Le GD est une structure particulièrement étudiée dans la maladie épileptique en raison de sa place centrale au sein du circuit polysynaptique hippocampique. Notamment, les connexions longitudinales du GD et du hile semblent nécessaires à la genèse et à la diffusion des activités épileptiques suite au remaniement morphologique de cette structure après injection intrahippocampique de KA chez la souris (Pallud et coll., 2008). De plus, le phénomène de dispersion des cellules granulaires du GD est une modification morphologique présente chez les patients atteints d'EMLT ainsi que dans le modèle de micro-injection intrahippocampique de KA chez la souris. Le rôle de cette atteinte neuroplastique dans l'excitabilité hippocampique et l'épileptogenèse reste à comprendre. La dispersion serait liée à un déficit en *reelin*, une protéine de la matrice extracellulaire (MEC), qui régule la migration neuronale, ce qui contribuerait ainsi au déplacement des neurones granulaires matures et la dispersion ne reposerait pas sur une neurogenèse accrue (Haas et Frotscher, 2009; Heinrich et coll., 2006).

### **IV.3. Neurogenèse**

L'intégration de nouveaux neurones à la couche granulaire du GD, à partir de précurseurs cellulaires localisés dans la zone sous-granulaire du GD, est maintenue durant toute la vie dans le SNC des mammifères. Cette neurogenèse est particulièrement critique pour les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Wojtowicz, 2008) et ce processus est sensible à de nombreuses conditions pathologiques, dont les crises épileptiques. En effet, les crises peuvent augmenter la prolifération des progéniteurs, et des traumatismes cérébraux comme le TC ou

l'AVC sont susceptibles d'augmenter le phénomène de neurogenèse (Kluska et coll., 2005 ; Pitkänen et McIntosh, 2006). Les nouveaux neurones induits par l'hypersynchronie neuronale possèdent une localisation aberrante au sein du hile, résultant en une connectivité modifiée et une excitabilité majorée (Parent et Murphy, 2008 ; Zhao et Overstreet-Wadiche, 2008). Ce néocircuit anormal pourrait contribuer à la récurrence des crises dans l'hippocampe épileptique. Si la stimulation de la neurogenèse paraît être plutôt néfaste dans les phases précoces, celle-ci tend à fortement diminuer par la suite (Heinrich et coll., 2006 ; Kralic et coll., 2005). Ceci a également été constaté chez les patients atteints d'EMLT (Fahrner et coll., 2007). Ce phénomène peut être relié à un épuisement du stock de cellules souches ou une déplétion en facteurs de croissance liée à la modification du micro-environnement hippocampique. Même si l'importance de cette diminution du phénomène de neurogenèse dans l'épileptogenèse reste à comprendre, cet événement pourrait en outre contribuer aux déficits cognitifs constatés chez les patients épileptiques (Kuruba et coll., 2009).

L'épileptogenèse est également caractérisée par la prolifération d'autres types cellulaires. En particulier, l'accroissement du nombre de progéniteurs, susceptibles de générer des neurones ou des astrocytes, au niveau de zones neurogéniques chez les patients atteints d'EPLT (Crespel et coll., 2005) pourrait avoir un lien avec l'existence d'une astrogliose, qui est une caractéristique commune à la majorité des patients. Une forte réactive astrogliale est également constatée dans la plupart des modèles animaux de cette maladie. Ainsi, les astrocytes ont fait l'objet d'une attention particulière et les recherches récentes ont suggéré une participation de ces cellules au développement de la maladie épileptique.

#### **IV.4.      Dysfonctionnement astrocytaire**

Les astrocytes ont longtemps été considérés comme des cellules de support nutritionnel et structurel des neurones. En fait, l'astrocyte communique activement avec les neurones et peut

sécréter du Glu par un mécanisme dépendant du calcium (Wetherington et coll., 2008) susceptible d'influencer fortement la transmission synaptique neuronale (Jourdain et coll., 2007; Perea et Araque, 2007). Ce processus pourrait également prendre part au phénomène de synchronisation neuronale, via l'action du Glu astrocytaire sur des récepteurs NMDA extrasynaptiques (Fellin et coll., 2004). Cette activation particulière semble liée aux phénomènes excitotoxiques (Gouix et coll., 2009; Leveille et coll., 2008).

Un rôle majeur des astrocytes est le maintien de l'homéostasie ionique et le contrôle des flux d'eau au sein du compartiment extracellulaire. Ainsi, des modifications des canaux astrocytaires d'eau (aquaporines) ou de potassium (KiR-4.1 notamment), aboutissant aux changements morphologiques des astrocytes (voir page 46) ainsi qu'à des variations d'osmolarité du compartiment extracellulaire, sont susceptibles de participer à la synchronisation des activités neuronales (David et coll., 2009 ; Wetherington et coll., 2008).

Les astrocytes sont remarquablement bien placés pour jouer un rôle dans la synchronisation neuronale de l'hippocampe sclérotique. En effet, l'important syncytium créé par les jonctions non synaptiques (*gap junctions*) entre les astrocytes, pourrait contribuer à la synchronisation de neurones distants (Rouach et coll., 2008). La vague calcique astrocytaire, initiée par la décharge épileptique de quelques neurones isolés, accompagnée de la libération diffuse et extrasynaptique de Glu, est susceptible d'induire la synchronisation d'une large population de neurones non nécessairement connectés entre eux par des synapses (Navarro, 2006). Même si ces éléments plaident en faveur d'un rôle potentiel des astrocytes dans l'épileptogénèse, il n'existe pas à ce jour d'études sur l'impact d'une inhibition de la gliose réactive sur l'épilepsie. L'utilisation de souris transgéniques, dont les astrocytes expriment une protéine virale permettant l'inhibition de la division cellulaire par l'administration d'un antiviral (le ganciclovir), a permis de répondre partiellement à cette question. Dans des modèles animaux de TC et de lésions de la moëlle épinière ou du cortex, il apparaît ainsi que

la suppression de l'astrogliose réactive est clairement néfaste (Bush et coll., 1999 ; Faulkner et coll., 2004 ; Myer et coll., 2006), suggérant donc un rôle global bénéfique de la réaction astrogliale.

Les astrocytes sont également capables de participer à la réaction neuro-inflammatoire en synthétisant et en réagissant à certaines cytokines et autres médiateurs (voir *infra*). Des réactions immunes et inflammatoires ont été décrites dans le SNC au cours de la maladie épileptique suggérant un rôle potentiel des événements inflammatoires dans l'épileptogénèse.

#### **IV.5. L'hypothèse inflammatoire**

Une observation d'importance a été effectuée par Kanemoto et coll. (2000) selon laquelle il existe une association forte entre un polymorphisme du gène d'une cytokine particulière, l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), chez les patients épileptiques présentant une SH comparée à des patients épileptiques sans SH ou non épileptiques. Ce polymorphisme favorise une production accrue d'IL-1 $\beta$ , ce qui implique cette cytokine dans le développement de la SH. Il a été également rapporté que des crises récentes chez des patients épileptiques provoquent l'induction de certaines cytokines comme l'IL-6 ou l'IL-1 $\beta$  (Bauer et coll., 2009 ; Hulkkonen et coll., 2004).

Les réactions inflammatoires dans le SNC semblent provenir de l'activation des deux branches du système immunitaire, à savoir l'immunité innée et adaptative. Ainsi, la barrière hémato-encéphalique (BHE) a fait l'objet de nombreuses études expérimentales au cours de la maladie épileptique, en raison de son rôle crucial dans la modulation de la communication fonctionnelle entre l'immunité innée et adaptative, par la régulation fine de l'entrée de cellules immunes sanguines, d'antigènes et d'anticorps et de certaines cytokines au sein du tissu cérébral. Les dommages de la BHE et l'angiogénèse sont une caractéristique commune aux agressions épileptogènes comme le SE, le TC, l'AVC et l'ischémie, ainsi que chez les

patients épileptiques atteints d'EPLT (Chopp et coll., 2008 ; Morgan et coll., 2007 ; Navarro et coll., 2008 ; Rigau et coll., 2007). L'activité épileptique, ainsi que l'occurrence de crises spontanées pourraient être associées à une ouverture de la BHE et à un phénomène d'angiogenèse (Hellsten et coll., 2005 ; Rigau et coll., 2007 ; van Vliet et coll., 2007). L'ouverture prolongée de la BHE peut engendrer des activités épileptiques *in vivo*, et ainsi contribuer au phénomène de synchronisation neuronale par une interaction complexe entre l'albumine et les astrocytes (Ivens et coll., 2007; Oby et Janigro, 2006 ; Seiffert et coll., 2004). L'ouverture de la BHE est chronique chez les patients atteints d'EPLT et le passage de protéines immunes comme les immunoglobulines et leur accumulation dans les neurones pourrait jouer un rôle dans la synchronisation neuronale (Rigau et coll., 2007). Ces éléments suggèrent que l'inflammation pourrait participer à la pathogenèse de différentes formes d'épilepsies d'étiologies différentes (Ravizza et coll., 2008). Le rôle des cellules résidentes du SNC dans les mécanismes inflammatoires sera discuté dans le chapitre III, page 41.

#### **IV.6. L'hypercholinergie hippocampique peut-elle induire un processus d'épileptogenèse ?**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hippocampe est une structure particulièrement apte à la synchronisation neuronale et donc aux crises épileptiques. Les facteurs responsables de cette propension particulière ne sont pas clairs mais l'un d'eux pourrait être l'innervation cholinergique massive de l'hippocampe. Des mutations spécifiques des récepteurs cholinergiques ont été ainsi décrites dans un syndrome épileptique idiopathique et les modèles animaux associés (Klaassen et coll., 2006 ; Steinlein et coll., 1995 ; Teper et coll., 2007). Une implication cholinergique dans l'EMLT a également été suggérée récemment (Friedman et coll., 2007 ; Zimmerman et coll., 2008). Cependant, les conséquences épileptogènes de variations cholinergiques focales au sein de structures cérébrales comme l'hippocampe demeurent peu étudiées.

## **Chapitre II**

### **Transmission cholinergique et épilepsie**

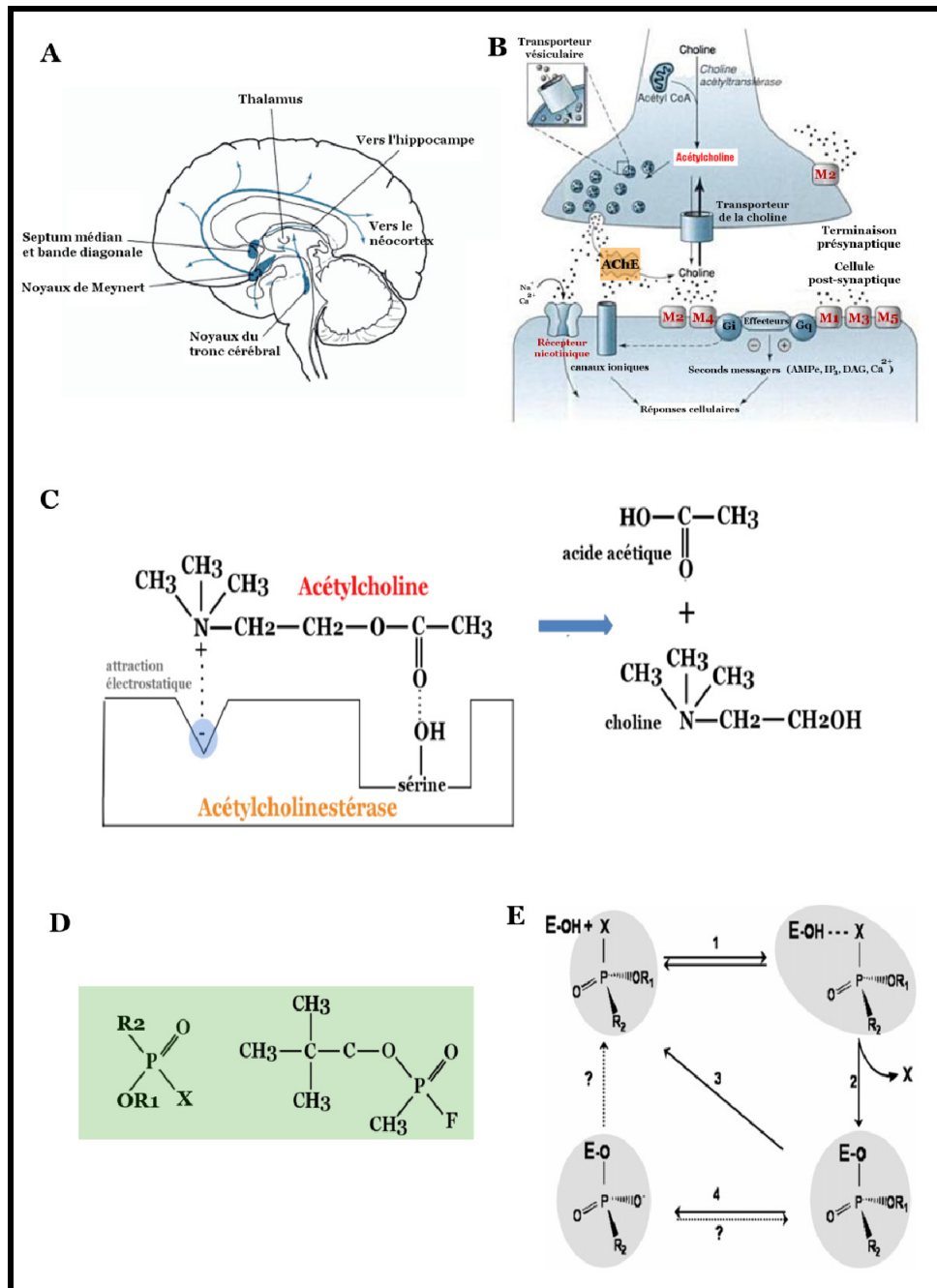


## **I. Rappels généraux**

L'ACh est distribuée largement au sein du système nerveux. Au niveau périphérique, elle est impliquée au niveau des plaques motrices, des ganglions périphériques, et du système nerveux autonome parasympathique. C'est également un neurotransmetteur majeur au sein du SNC. La transduction de l'information cholinergique implique les récepteurs nicotiques (N, à activité rapide) et muscariniques (M, à activité plus lente), en référence aux agonistes sélectifs de ce type de récepteurs (Brown, 2006).

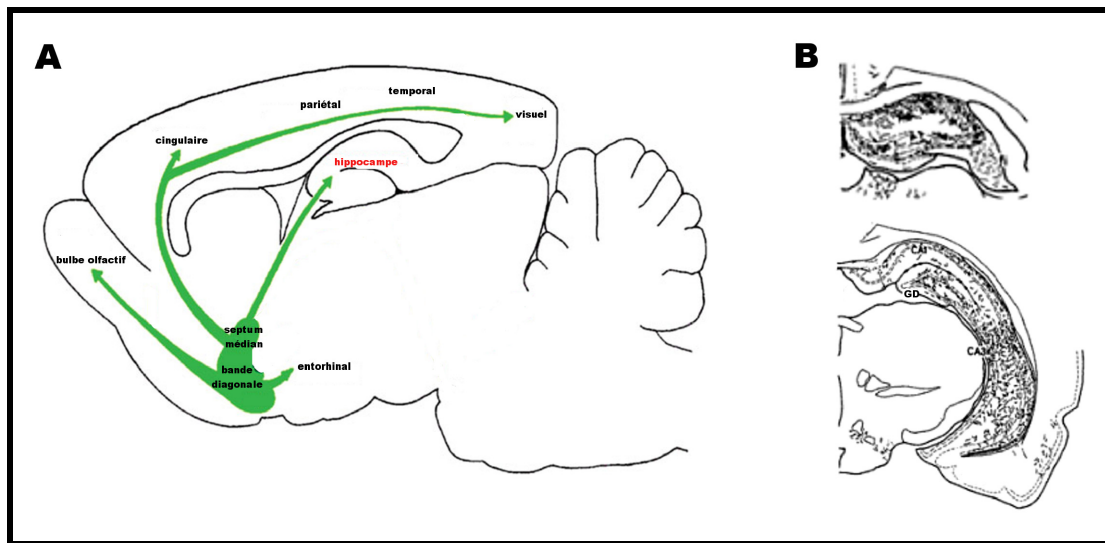
La biosynthèse de l'ACh peut être divisée en trois processus distincts : (i) la recapture de la choline depuis la fente synaptique ; (ii) la synthèse de l'ACh par acétylation et (iii) son stockage dans une vésicule d'exocytose (Figure 5). Une fois libérée dans la fente synaptique, l'ACh agit sur ses récepteurs spécifiques avant d'être dégradée en acétate et choline par l'acétylcholinestérase (AChE). L'inhibition de cette enzyme clé étant à la base du mécanisme toxique des organophosphorés (OP), comme le soman que nous avons étudié, nous développerons particulièrement ce chapitre (Figure 5B).

**Figure 5. Voies, mécanismes synaptiques, régulation de la transmission cholinergique et inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés**



(A), système cholinergique dans le cerveau humain : la principale innervation cholinergique provient du noyau de Meynert et du complexe septum médian/bande diagonale. (B), modèle de synapse cholinergique : sous l'action rapide de l'acétylcholinestérase (AChE), c'est le métabolite de l'acétylcholine (ACh), la choline, qui est recyclé dans l'élément présynaptique. (A) et (B) d'après Nestler et coll. (2008). (C), mécanisme de dégradation de l'ACh par l'AChE : le groupement nucléophile du résidu sérine du site actif joue un rôle fondamental dans la dégradation de l'ACh. (D), structure chimique générale des organophosphorés (OP), de puissants inhibiteurs de l'AChE, et structure du soman. (E), mécanisme d'inhibition de l'AChE par les OP : après formation d'un complexe irréversible avec l'AChE (1), la sérine du site actif est phosphorylée (2). L'enzyme phosphorylée peut être réactivée par des agents nucléophiles comme les oximes (3). Le conjugué phosphylé peut être désalkylé spontanément (4) ce qui correspond au processus de « vieillissement » de l'enzyme. L'enzyme vieillie ne peut plus être réactivée par les oximes. Ce processus peut être très rapide (de l'ordre de 3 min avec le soman). D'après Masson et Rochu (2009).

**Figure 6. Innervation cholinergique de l'hippocampe chez le rat**



(A), l'hippocampe reçoit une innervation cholinergique par le complexe septum médian/bande diagonale *via* le fornix. (B), un réseau de fibres cholinergiques effectuent des contacts synaptiques avec les cellules pyramidales, les cellules granulaires, les interneurons et le hile ; d'après Amaral and Lavenex (2007).

Le récepteur M fait partie de la classe des récepteurs couplés aux protéines G (à sept hélices transmembranaires) et est largement distribué au sein du SNC. Les expérimentations de clonage distinguent aujourd'hui cinq sous-types, M1 à M5 (Servent et Fruchart-Gaillard, 2009), généralement divisés en deux classes en fonction de leur signal de transduction. Certains sont couplés à la famille Gq des protéines G, qui mobilise le calcium intracellulaire et est responsable d'une dépolarisation (M1, M3, M5), tandis que d'autres sont couplés à la famille Gi, qui induit une réduction de la concentration en adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et est responsable d'hyperpolarisation (M2, M4).

Le sous-type M1 est le récepteur M le plus représenté au sein du SNC, où il est principalement localisé au sein du cortex, de l'hippocampe, du striatum et du thalamus avec une localisation post-synaptique. Au sein de l'hippocampe, le gène M1 s'exprime abondamment au niveau des cellules pyramidales de CA1 et CA3 et des cellules granulaires du GD. Sur les cellules pyramidales de la couche CA1, M1 et le récepteur NMDA sont colocalisés et pourraient interagir directement par un signal intracellulaire (Marino et coll., 1998). L'action pro-ictogène de la pilocarpine dépend de l'activation des récepteurs M1

puisque les souris déficientes en ce récepteur ne développent pas de SE suite à l'injection de cette substance (Curia et coll., 2008). Les effets excitateurs de l'ACh semblent liés à l'activation post-synaptique des récepteurs M, par le blocage des conductances potassiques (Cole et Nicoll, 1984 ; Madison et coll., 1987) ou l'activation de courant cationique dépendant du calcium (Egorov et Muller, 1999). Au niveau présynaptique, ils peuvent moduler la libération de Glu (Buno et coll., 2006), de GABA (Salgado et coll., 2007) et d'ACh (Stoll et coll., 2009).

M2 et M4 sont également largement distribués au sein du SNC, généralement dans les mêmes régions que M1, où ils résident majoritairement sur les terminaisons synaptiques cholinergiques (Rouse et coll., 1997) et exercent une fonction d'autorécepteur présynaptique avec une action prédominante sur la sécrétion d'ACh (Raiteri et coll., 1990).

Les récepteurs N sont des protéines membranaires appartenant à la superfamille des canaux ioniques activés par un neurotransmetteur. Ces récepteurs-canaux participent à la transmission du signal physiologique associé à la sécrétion d'ACh, au niveau périphérique et au sein du SNC. L'action d'un agoniste permet le passage sélectif de cations, notamment  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , et la dépolarisation consécutive de la membrane cellulaire et l'ouverture de canaux activés par le voltage membranaire. Le canal est formé par l'arrangement homo- ou hétéropentamérique de sous-unités fonctionnelles  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ) et  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ). Les études pharmacologiques portant sur la sélectivité d'agoniste (nicotine) ou d'antagoniste ( $\alpha$ -bungarotoxine) ont permis de répartir les récepteurs nicotiques centraux en deux classes majeures : ceux contenant les sous-unités  $\alpha 4$ - $\beta 2$ , à forte affinité pour la nicotine et ceux contenant la sous-unité  $\alpha 7$ , à faible affinité pour la nicotine et sensibles à l' $\alpha$ -bungarotoxine.

Plusieurs études ont permis de préciser les fonctions physiologiques de l'ACh endogène induites par la stimulation des récepteurs nicotiques centraux (Gotti et Clementi, 2004).

L'utilisation de modèles *knock-out* a permis également de constater une localisation spécifique de ces différentes sous-unités au sein du SNC (Cordero-Erausquin et coll., 2000). Ainsi, les récepteurs  $\alpha 4\text{-}\beta 2$  sont principalement localisés au sein du thalamus et du cortex tandis que la sous-unité  $\alpha 7$  est majoritairement localisée au sein du système limbique, et de l'hippocampe en particulier. Ces deux types de récepteurs peuvent avoir une localisation pré- ou post-synaptique.

Le gène du récepteur  $\alpha 7$  est exprimé sur de nombreuses synapses GABAergiques et glutamatergiques de l'hippocampe (Fabian-Fine et coll., 2001). Le flux calcique engendré par l'activation des récepteurs  $\alpha 7$  pourrait jouer un rôle important dans la plasticité synaptique et la modulation de la sécrétion de neurotransmetteurs et/ou l'induction de flux calcique en provenance des réserves intracellulaires (Khiroug et coll., 2003). En particulier, la stimulation du sous-type  $\alpha 7$  est apparue pouvoir assurer une défense contre les effets toxiques dépendants du récepteur NMDA *in vitro* (Dajas-Bailador et coll., 2000 ; Kaneko et coll., 1997) même si les interactions avec la transmission glutamatergique sont certainement plus complexes.

La stimulation du sous-type  $\alpha 4\text{-}\beta 2$  aurait également un rôle neuroprotecteur (Belluardo et coll., 2000). Cependant, les animaux mutants homozygotes possédant des récepteurs  $\alpha 4$  hypersensibles meurent tôt après la naissance (Orr-Urtreger et coll., 2000), tandis que les souris hétérozygotes survivent avec une augmentation de comportement anxieux. L'hippocampe de ces animaux est hypersensible à la nicotine et produit, sous l'action de l'agoniste, une augmentation de l'amplitude du tracé EEG et de la puissance de la bande  $\theta$  (Fonck et coll., 2003).

## II. Acétylcholine et neurodégénérescence

L'ACh n'est pas neurotoxique lorsqu'elle est injectée dans des régions cérébrales (Olney et coll., 1986 ; Sloviter et Dempster, 1985) ou appliquée sur des cultures neuronales (Mattson, 1989). De nombreuses indications expérimentales suggèrent que l'ACh, et les agonistes nicotiques en particulier, exercent des propriétés neuroprotectrices (Akaike et coll., 2009). A la fois *in vitro* et *in vivo*, les agonistes nicotiques protègent les neurones corticaux, striataux et hippocampiques des acides aminés excitotoxiques (Shimohama, 2009). Il se peut également que l'action neuroprotectrice de l'ACh passe par des mécanismes anti-inflammatoires.

## III. Acétylcholine et neuro-inflammation

Les données récentes indiquent un rôle majeur des récepteurs nicotiques dans les fonctions neuro-immunologiques. En effet, au niveau du système nerveux périphérique, des études suggèrent que le nerf vague agit comme un acteur anti-inflammatoire qui régule la réponse inflammatoire systémique en activant les récepteurs  $\alpha 7$  nicotiques présents sur les macrophages sanguins (Wang et coll., 2003). Un rôle similaire a été attribué à l'ACh au sein du SNC, en agissant cette fois sur l'activation microgliale (Shytle et coll., 2004). Cette étude suggère fortement l'existence d'une régulation des fonctions immunes de la microglie par l'ACh endogène. Les astrocytes étant capables de sécréter de l'ACh (Wessler et coll., 1997), pourraient également réguler l'activation microgliale par cette voie.

Ainsi, les agonistes nicotiques induisent des mécanismes capables de diminuer les réponses inflammatoires locales. L'ACh et la nicotine réduisent par exemple considérablement la production du facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ,

TNF $\alpha$ ) des cultures de cellules microgliales activées par le lipopolysaccharide (LPS) bactérien (De Rosa et coll., 2005; Shytle et coll., 2004 ; Suzuki et coll., 2006).

#### **IV. Acétylcholine et épilepsie**

Les récepteurs M sont présents majoritairement au niveau post-synaptique où ils induisent les effets excitateurs de l'ACh (voir page 31). Les études *in vitro* sur coupes d'hippocampe ont montré que l'activation de ces récepteurs produit l'apparition de décharges neuronales synchronisées ressemblant aux activités épileptiques *in vivo* (McVicar et Tse, 1989 ; Williams et Kauer, 1997). L'application d'ACh, d'agonistes muscariniques et d'inhibiteurs de ChE induit en effet *in vitro* une augmentation de l'excitabilité des neurones pyramidaux hippocampiques en réduisant l'hyperpolarisation post-décharge et le phénomène d'accommodation (une propriété des neurones à réduire la fréquence des décharges lorsqu'ils sont soumis à une impulsion constante) (Cole et Nicoll, 1984 ; Oh et coll., 1999). Nous avons vu précédemment également que l'hippocampe contenait des récepteurs nicotiniques au niveau des cellules principales de cette structure. Ces récepteurs sont idéalement placés pour réguler l'excitabilité neuronale des circuits hippocampiques où ils sont localisés au niveau pré-, post- ou extrasynaptique (Williams et Kauer, 1997). *In vivo* également, il a été démontré depuis une vingtaine d'années que l'administration d'agonistes muscariniques (comme la pilocarpine) ou nicotiniques (comme la nicotine) à fortes doses induisait des crises limbiques chez l'animal (Turski et coll., 1983b; Damaj et coll., 1999). Des études génétiques ont de plus indiqué que la mutation de récepteurs nicotiniques pouvait être cruciale dans certaines formes d'épilepsie idiopathique (Elmslie et coll., 1997; Steinlein et coll., 1995).

Des modifications synaptiques à long terme sont induites par une activation cholinergique non physiologique de l'hippocampe (Ovsepian, 2008 ; Scheiderer et coll., 2008 ; Welsby et coll., 2009). En particulier, la stimulation de récepteurs cholinergiques peut déséquilibrer la

balance des activités glutamatergiques et GABAergiques (voir page 31 et 32) avec des conséquences potentielles sur l'activité épileptique.

## **V. Inhibition des cholinestérases : conséquences épileptogènes**

### **V.1. Rappels sur les cholinestérases**

L'AChE est une enzyme extracellulaire, libre ou fixée à la surface externe des cellules, et un composant clé des synapses cholinergiques cérébrales et des jonctions neuromusculaires. D'autres enzymes, moins spécifiques, proches de l'AChE comme la butyrylcholinestérase ou la carboxylcholinestérase métabolisent l'ACh dans le plasma. Le rôle physiologique exact de ces enzymes est encore évasif.

Du point de vue structural, l'AChE est une enzyme de la famille des protéases à sérine. C'est une enzyme polymorphe pouvant comporter plusieurs sous-unités catalytiques. C'est une enzyme exceptionnellement rapide, avec un taux de catalyse proche des limites imposées par la diffusion des substrats et des produits. Il a alors été surprenant de constater, grâce à la cristallographie de l'AChE, que le site actif est enclavé dans le corps de l'enzyme, seulement accessible par une profonde et étroite « gorge catalytique ». Cette accessibilité restreinte devrait limiter le taux de catalyse, ce qui n'est pas le cas. Parmi d'autres hypothèses, il semblerait que la conformation de l'enzyme soit plus dynamique que celle suggérée par la cristallographie (Silman et Sussman, 2008).

De nombreux composés, alcaloïdes ou extraits naturels possèdent des propriétés inhibitrices des ChE. Bien que réversible, cette inhibition conduit à une augmentation de la concentration en ACh, une augmentation du temps d'action du neurotransmetteur sur ces récepteurs et donc à une augmentation de la réponse cholinergique. Certains de ces inhibiteurs réversibles affectent directement le processus de mémorisation chez les



mammifères. Les plus importants comme la galantamine (Razadyne<sup>®</sup>), le donepezil (Aricept<sup>®</sup>), la rivastigmine (Exelon<sup>®</sup>) et la tacrine (Cognex<sup>®</sup>) ont satisfait aux études précliniques et cliniques pour le traitement symptomatique des formes légères à modérées de la maladie d'Alzheimer où leur emploi conduit à des améliorations des performances mnésiques et cognitives.

## **V.2. Rappels sur les organosphosphorés**

L'effet létal d'une inhibition massive des ChE a conduit à la synthèse d'agents chimiques de guerre parmi les plus dangereux, à action neurotoxique (neurotoxiques organosphosphorés, NOP). Les NOP sont des dérivés de l'acide phosphorique ou de l'acide phosphonique (Figure 5D) et sont caractérisés par leur puissante action inhibitrice des ChE. L'atome de phosphore de la molécule de NOP se fixe sur le groupement nucléophile du résidu sérine du site actif de l'AChE (Figure 5). L'enzyme est alors phosphorylée irréversiblement (conjugué enzyme-NOP) et n'est plus fonctionnelle sous cette forme (Figure 5E). L'hydrolyse spontanée de la liaison avec le NOP n'est généralement pas observée ou celle-ci est très lente. En revanche, des composés fortement nucléophiles comme les oximes peuvent réagir chimiquement avec le NOP en rompant le complexe NOP-enzyme et en éliminant le groupement phosphoryl (phosphoryl ou phosphonyl) du site actif. Toutefois, dans certains cas, une désalkylation du NOP entraîne des modifications structurales empêchant toute réactivation spontanée ou provoquée par les oximes. C'est le phénomène de vieillissement (Figure 5E), particulièrement rapide pour le soman, l'un des principaux toxiques de la menace.

Les NOP existent sous forme de liquides plus ou moins volatils à température ordinaire. Ils présentent donc un danger « liquide » par voie percutanée en particulier, et un danger « vapeur » par voie respiratoire. Leur propriété lipophile leur confère une grande capacité à traverser les barrières biologiques et à exercer une toxicité sur le SNC.

Les NOP, en inhibant irréversiblement l'AChE, provoquent une accumulation d'ACh au niveau des synapses cholinergiques. Une crise cholinergique s'ensuit, provoquée par l'hyperstimulation des récepteurs M et N au sein du SNC et du système nerveux périphérique. Les symptômes incluent salivation, lacrymation, relâchement des sphincters, fasciculations et phénomènes respiratoires dont la bronchoconstriction. De plus, des intoxications avec des doses sub-létales ou létales de NOP peuvent entraîner des crises convulsives et un épisode de SE (McDonough et Shih, 1997). Ces crises épileptiques semblent s'initier majoritairement par l'hyperstimulation des récepteurs M, ce qui modifie la balance excitation/inhibition au sein du SNC (Grasshoff et coll., 2003; Lallement et coll., 1991). Des dommages cérébraux sont associés à ces crises. Même lorsque la mort est prévenue pharmacologiquement, ou lorsque la dose d'intoxication est sub-létale, des déficits neurologiques et comportementaux à long terme peuvent ainsi se développer (Bajgar et coll., 2004 ; Carpentier et coll., 2008 ; Myhrer et coll., 2005).

### **V.3.Conséquences neuropathologiques de l'intoxication systémique**

De nombreux laboratoires ont centré leurs recherches sur les mécanismes physiopathologiques au sein du SNC et sur le traitement des dommages cérébraux associés aux crises épileptiques induites par le soman.

Des modèles d'intoxication systémique chez le rat ou la souris ont permis une première description exhaustive des atteintes tissulaires liées à l'intoxication par le soman (Lemerrier et coll., 1983) et de confirmer l'apparition rapide d'événements EEG anormaux évoluant rapidement en SE de longue durée (Carpentier et coll., 1990 ; Carpentier et coll., 1994). La vision actuelle du mécanisme d'induction des crises épileptiques induites par les NOP comprend trois phases : (i) une phase cholinergique précoce ; (ii) une phase de transition et (iii) une phase glutamatergique (Carpentier et coll., 2008; Shih et McDonough, 1997). La

phase cholinergique démarre immédiatement après l'intoxication et dure approximativement une vingtaine de minutes. L'augmentation rapide des taux d'ACh cérébrale touche en premier lieu les synapses cholinergiques de la région du septum et du GD dès la période précédant les crises. Deux régions sont particulièrement impliquées dans l'initiation des crises épileptiques : le cortex piriforme et le septum médian (Myhrer, 2007). Durant ce stade, le SE peut être stoppé efficacement par l'action d'antagonistes muscariniques (Carpentier et coll., 2000).

Le recrutement du système glutamatergique va prendre progressivement le relais de l'hyperstimulation cholinergique ; ceci probablement en lien avec la capacité de neuromodulation de l'ACh dans l'hippocampe (voir page 31), ce qui explique la perte d'efficacité progressive des antagonistes muscariniques (McDonough et Shih, 1997 ; Shih et McDonough, 1999). Une augmentation de la concentration extracellulaire de Glu apparaît ainsi dans de nombreuses régions cérébrales (CA1, CA3, GD, amygdale, cortex piriforme et septum), stimulant l'ensemble des récepteurs glutamatergiques présents (Lallement et coll., 1991). En particulier, l'hyperstimulation du sous-type NMDA va entraîner l'apparition des premiers dommages cérébraux par des mécanismes excitotoxiques impliquant l'augmentation de calcium intracellulaire. D'autres modifications ont été observées, notamment une perte d'efficacité des benzodiazépines, pouvant s'expliquer par une internalisation des récepteurs de type GABA<sub>A</sub>, une caractéristique commune au développement du SE de différentes origines (Chen et Wasterlain, 2006).

La dernière phase est totalement non cholinergique et débute environ 30 min après le début des crises épileptiques. A ce stade, les composés antimuscariniques sont inefficaces et le système glutamatergique devient le principal contributeur au maintien des crises, comme le montre l'efficacité sélective des antagonistes NMDA durant la période 30-60 min (Dorandeu et coll., 2010).

### **Neuropathologie et similitude avec les modèles animaux d'EPLT**

Dans le cas de l'intoxication par le soman, les lésions cérébrales accompagnent toujours les crises épileptiques de durée et de puissance suffisantes (Baille et coll., 2005 ; Carpentier et coll., 2001b). Les lésions cellulaires observées ne sont pas liées à une action cytotoxique directe du soman lui-même, comme démontré sur des neurones en culture (Wang et coll., 2008). Les mécanismes impliqués *in vivo* dans les mécanismes neuropathologiques sont très certainement d'ordre excitotoxique via l'activation secondaire du système glutamatergique. L'examen histopathologique cérébral des animaux intoxiqués par le soman montre de nombreuses analogies avec les modèles animaux d'EPLT post-SE générés avec le KA ou la pilocarpine (voir page 16). En effet, les régions les plus touchées sont l'hippocampe (sélectivement les régions CA1 et CA3), les cortex piriforme et entorhinal, le striatum et le thalamus. Toutefois, la région CA1 semble plus touchée dans le modèle soman que dans le modèle KA systémique. Une certaine analogie avec le modèle d'intoxication systémique au KA concerne la sensibilité aux antiépileptiques classiques (insensibilité à la diphénylhydantoïne, à la carbamazépine et au valproate et efficacité des benzodiazépines dans la mesure où une administration rapide de ces composés peut être réalisée).

Comme dans les autres modèles de SE, une réaction neuro-inflammatoire de forte amplitude a été rapportée chez la souris (Dhote et coll., 2007). L'induction d'un SE, les analogies avec les modèles animaux d'EPLT post-SE ainsi que certains indices expérimentaux suggèrent la mise en place d'une épileptogenèse qui a été confirmée récemment (Furtado et coll., 2009).

#### **V.4. Conséquence d'une inhibition des cholinestérases hippocampiques**

L'activation cholinergique de l'hippocampe *in vivo* induit des phénomènes épileptiques (Baker et Benedict, 1968; Furtado et coll., 2002 ; Meurs et coll., 2006 ; 2008 ; Smolders et

coll., 2004). Cependant, l'injection intrahippocampique *in vivo* d'inhibiteurs de ChE est peu documentée. Une seule étude existe où le soman a été injecté dans l'hippocampe de rat (McDonough et coll., 1987). Dans ce cas, aucun effet majeur n'a pu être détecté au cours des 6 h d'observation. A l'inverse, l'injection de soman dans l'amygdale provoquait des effets cliniques et neuropathologiques similaires à l'intoxication systémique. Cette action préférentielle du soman sur l'amygdale renforce le rôle de cette structure dans l'initiation et/ou la propagation de l'activation neuronale suite à l'injection systémique de soman. Ceci a également été confirmé *in vitro* (Apland et coll., 2009 ; Aroniadou-Anderjaska et coll., 2009).

## **Chapitre III**

### **La neuro-inflammation, un lien avec l'épileptogenèse ?**

L'inflammation est un mécanisme protecteur visant à isoler le tissu lésé du tissu sain, à détruire les cellules endommagées et à initier la réparation de la MEC. La réponse inflammatoire fait intervenir des acteurs cellulaires, des composants de la MEC et de nombreux médiateurs chimiques pouvant modifier ou entretenir celle-ci. Ce processus peut potentiellement exister au sein de n'importe quel compartiment vascularisé du corps, dont le SNC. Ainsi, le SNC réagit en cas d'agression (traumatique, ischémique ou infectieuse, etc.) par la mise en action de différents types cellulaires interagissant les uns avec les autres par des mécanismes extraordinairement complexes. L'inflammation centrale peut s'accompagner d'une invasion de cellules immunitaires périphériques, d'une réaction gliale et de l'installation d'un œdème. Les cellules gliales résidentes du SNC (microglie, astrocytes, cellules épendymaires, oligodendrocytes) mais aussi les cellules endothéliales sont impliquées dans le processus inflammatoire. L'ensemble de ces mécanismes cellulaires met également en jeu de nombreux médiateurs moléculaires spécifiques (interleukines, chimiokines, eicosanoïdes, etc.) pouvant exercer des fonctions variables et parfois antagonistes, permettant ainsi le contrôle du processus neuro-inflammatoire.

## **I. Intervention des cellules immunitaires sanguines**

L'initiation du processus neuro-inflammatoire induit la migration de cellules mononuclées en provenance du sang au sein du parenchyme cérébral. La compréhension des mécanismes de pénétration de ces cellules progresse rapidement (Rebenko-Moll et coll., 2006). Il semble qu'il s'agisse d'un phénomène hautement séquentiel, composé d'interactions multiples entre le leucocyte et l'endothélium vasculaire, directement lié à l'induction de signaux chimiotactiques exercés par les chimiokines présentes sur la surface endothéliale. Le processus chimiotactique est associé à la synthèse de molécules d'adhésion comme les intégrines. L'ancrage des leucocytes à l'endothélium capillaire s'effectue par l'intermédiaire

d'autres molécules d'adhésion ou de certains composants de la MEC (Navarro, 2007). Ce processus aboutit finalement à la traversée des leucocytes par diapédèse entre les jonctions serrées interendothéliales (Engelhardt et Ransohoff, 2005 ; Luster et coll., 2005). Pour investir le parenchyme cérébral, les leucocytes doivent ensuite solubiliser la membrane basale de l'endothélium. Pour cela, le remaniement de la MEC, par la synthèse de métalloprotéinases matricielles (MMP, en particulier MMP-9), permet la dégradation de certaines glycoprotéines de la membrane basale et l'infiltration leucocytaire. Certains mécanismes particuliers comme le processus de dégradation des chaînes de sulfate d'héparane, constituants des protéoglycanes, semble être essentiel à l'infiltration des leucocytes circulants (Celie et coll., 2009). Ce mécanisme semble particulièrement important en raison de son intervention dans le remodelage tissulaire, la synthèse de facteurs neurotrophiques ainsi que dans la constitution de la cicatrice gliale (Navarro et coll., 2008 ; Properzi et coll., 2008).

L'infiltration de cellules périphériques semble avoir des conséquences complexes (Rezai-Zadeh et coll., 2009). Bien qu'une étude récente ait démontré un lien étiologique entre le recrutement leucocytaire et le développement de la maladie épileptique (Fabene et coll., 2008), certaines questions restent non élucidées (voir Vezzani et Janigro, 2009). En fait, il est possible que cette infiltration soit transitoire et hautement sélective (Silverberg et coll., 2009).

Les cellules immunes périphériques ne sont pas les seules à participer au processus neuro-inflammatoire, et une part fondamentale des événements est effectuée par les cellules résidentes du SNC. Ainsi, les neurones et les cellules gliales sont capables de produire une grande variété de molécules à visée inflammatoire ou immune, incluant des interleukines, des chimiokines et des eicosanoïdes notamment.

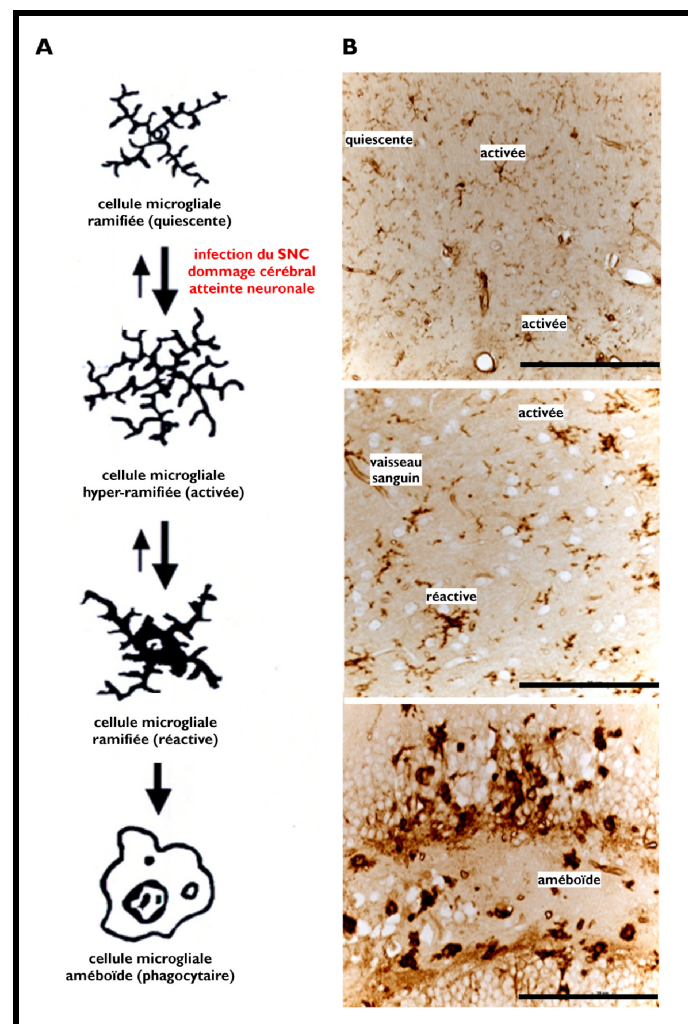


## **II. La microglie et les astrocytes : des médiateurs cellulaires de la neuro-inflammation cérébrale**

### **II.1. La microglie**

Les cellules microgliales représentent 5 à 20 % des cellules gliales centrales et prédominent dans la substance grise, où elles sont des cellules satellites des neurones. Elles sont également présentes sous la glie limitante externe et au voisinage des vaisseaux sanguins. La cellule microgliale a un rôle central, de part sa distribution homogène et son extrême mobilité, dans le maintien de l'intégrité du SNC. Ces cellules sont en effet extrêmement sensibles aux variations de l'homéostasie cérébrale et répondent rapidement aux dommages neuronaux (Hailer, 2008). Elles peuvent acquérir des propriétés de phagocytose au niveau des sites de lésions. Elles font aussi office de cellules présentatrices d'antigènes et interagissent avec les cellules du système immunitaire en provenance de la périphérie. Ces propriétés permettent l'initiation et le maintien de la réaction inflammatoire locale par la production de cytokines et de leurs récepteurs (voir page 47), d'eicosanoïdes (voir page 54), de composants du complément, de radicaux oxydants, de protéases et d'oxide nitrique. Cette activation microgliale est un facteur clé de la défense du SNC contre les maladies infectieuses, les traumatismes, les tumeurs et la neurodégénérescence. Elle est caractérisée par des modifications de leur morphologie cellulaire, de leur nombre et par la production de médiateurs inflammatoires. Sur un plan morphologique, l'activation microgliale correspond au passage d'une forme ramifiée quiescente à une forme améboïde (Figure 7), exprimant des marqueurs associés à la fonction de phagocytose.

**Figure 7. Variations morphologiques au cours de l'activation microgliale**



(A), représentation schématique des variations morphologiques de la cellule microgliale suite à son activation par une agression du SNC ; d'après Streit et coll. (1999). (B), exemples de différentes morphologies observées lors des travaux expérimentaux (voir Section B, page 119). Les cellules microgliales ont été marquées à l'aide de la lectine GSA-IB4. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

L'isolectine IB4 dérivée de *Griffonia simplicifolia* permet la visualisation des cellules microgliales, mais ne permet cependant pas de différencier les cellules microgliales activées (améboïdes) des macrophages en provenance de la périphérie. L'activation microgliale a des rôles antagonistes : sécrétion de facteurs neurotrophiques et protecteurs contribuant à la régénération neuronale mais aussi production de facteurs neuro-inflammatoires potentiellement délétères. Les données existantes semblent plutôt indiquer un effet neuroprotecteur d'une diminution de l'activation microgliale induite par certains

immunosuppresseurs (Tokime et coll., 1996 ; Zawadzka et Kaminska, 2005) ou par l'administration de minocycline (Filipovic et Zecevic, 2008; Riazi et coll., 2008).

## **II.2. Les astrocytes**

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses au sein du SNC. Les cellules astrocytaires ont un rôle essentiel dans l'homéostasie cérébrale et la fonction neuronale. Comme déjà évoqué précédemment, dans les conditions physiologiques, ils contribuent à la prolifération, la survie et la maturation des neurones en développement, en induisant et stabilisant les synapses et en intégrant les afférences neuronales. Ils jouent également un rôle de maintien et de support métabolique en régulant les taux extracellulaires de potassium, et en participant au métabolisme synaptique du Glu. Ils exercent un rôle majeur dans la régulation de la transmission synaptique (voir page 24). Ils jouent également un rôle dans la formation et la maintenance de la BHE, contribuant à son intégrité structurale et fonctionnelle et régulant l'accès des cellules immunocompétentes sanguines au parenchyme cérébral. Une des caractéristiques communes de cette population hétérogène est l'expression constitutive de la protéine acide des gliofilaments (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) (Wang et Bordey, 2008).

Les astrocytes répondent aux infections du SNC et aux dommages cérébraux de manière rapide par une hypertrophie, constituant le mécanisme d'astrogliose marqué par l'augmentation de l'expression de la protéine GFAP (Little et O'Callaghan, 2001). Leur prolifération en revanche, est controversée. Les astrocytes activés constituent autour de la lésion une barrière physique et chimique dite «cicatrice gliale». L'astrocyte activé synthétise de nombreux médiateurs faiblement présents au sein des astrocytes quiescents et qui contribuent à l'environnement inflammatoire du SNC (Dong et coll., 2001). Il est en effet maintenant bien établi que les astrocytes ont un rôle central dans la régulation neuro-

inflammatoire et qu'ils produisent, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, un large éventail de molécules impliquées dans le processus inflammatoire, comme des interleukines ou des chimiokines au sein du SNC lésé (Benveniste, 1997 ; Van Wagoner et Benveniste, 1999 ; Brambilla et coll., 2005 ; van Loo et coll., 2006). Les médiateurs sécrétés peuvent induire l'activation de cellules avoisinantes et ainsi amplifier localement la réponse immune, modifier la perméabilité membranaire et permettre l'attraction de cellules immunocompétentes dans le parenchyme cérébral.

En fonction du contexte pathologique, l'astroglie, comme l'activation microgliale, peut avoir des répercussions antagonistes : elle peut être associée à la promotion et à la survie neuronale par la production de facteurs neurotrophiques, par une délimitation de la zone endommagée, par une limitation de l'extravasation leucocytaire et par la promotion de la réparation de la BHE (Bush et coll., 1999 ; Faulkner et coll., 2004) ; par contre, la cicatrice gliale, qui isole la lésion, peut compromettre le processus de réparation (Itoh et coll., 2007).

### **III. Les médiateurs moléculaires de la neuro-inflammation cérébrale**

#### **III.1. Les cytokines**

##### ***III.1.1. Généralités***

Les cytokines sont des facteurs solubles peptidiques synthétisés et libérés par diverses cellules intervenant dans la réponse inflammatoire. Elles permettent la communication intercellulaire au niveau local, de manière autocrine ou paracrine, et parfois sur de plus longues distances, par l'intermédiaire de récepteurs membranaires de haute affinité. Ces cytokines et leurs récepteurs sont exprimés dans le SNC et peuvent provenir des cellules immunes périphériques invasives ou des cellules résidentes du SNC.

L'expression et l'activité de ces molécules sont augmentées dans des conditions de « stress » tissulaire, incluant les phénomènes d'expansion et de différenciation au cours de l'embryogenèse, et des mécanismes de défense et de réparation au cours d'infections ou autres traumatismes. Les cellules neuronales, en plus d'être des récepteurs du message cytokinique, sont également capables d'être la source de chimiokines, comme la fractalkine par exemple, qui influence les fonctions astrocytaires et microgliales (Cardona et coll., 2006 ; Kerschensteiner et coll., 2009).

### ***III.1.2.L'interleukine-1***

L'IL-1 fait référence à une famille de protéines qui interagissent sur des récepteurs membranaires. La famille de l'IL-1 est composée de deux isoformes polypeptidiques de 17 kilodaltons (kDa) jouant le rôle d'agonistes, IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  et d'un antagoniste endogène, IL-1Ra. Ces trois protéines sont produites sous forme de précurseurs. Alors que les précurseurs d'IL-1 $\alpha$  et IL-1Ra sont biologiquement actifs, la pro-IL-1 $\beta$  doit être clivée par la caspase-1 pour induire un effet biologique.

Bien qu'elles soient encodées par des gènes différents, IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  exercent des actions biologiques identiques. L'action de l'IL-1 s'effectue par le biais d'un récepteur unique (IL-1RI), appartenant à la superfamille des récepteurs Toll/IL-1, définie par un domaine intracellulaire commun. La transduction du signal requiert l'association à une protéine accessoire l'IL-1RAcP (*IL-1 receptor accessory protein*) pour augmenter l'affinité de liaison et initier le signal de transduction. L'activation de l'IL-1RI induit une voie intracellulaire très complexe impliquant une cascade de kinases (IL-1RK) gérée par de multiples molécules adaptatrices et aboutissant à une cascade séquentielle d'événements intracellulaires culminant en l'activation de facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B (Figure 8A). IL-1RI est exprimé majoritairement au sein de structures riches en neurones, comme le GD, la couche

pyramidale de l'hippocampe ainsi que l'hypothalamus (Cunningham et De Souza, 1993) (French et coll., 1999). Un second récepteur à l'IL-1 existe, IL-1RII. Il est dénommé récepteur appât en raison de l'absence de domaine intracellulaire et de signaux biologiques induits (Docagne et coll., 2005). Le récepteur IL-1RII lie à la fois la pro-IL-1 $\beta$  et l'IL-1 $\beta$ , prévenant ainsi la maturation de l'IL-1 $\beta$  et empêchant la liaison de l'IL-1 $\beta$  mature au récepteur fonctionnel.

L'IL-1Ra est un autre composant régulateur de l'action de l'IL-1. IL-1Ra n'est pas recruté suite à la liaison d'IL-1Ra sur le récepteur IL-1RI. IL-1Ra est un antagoniste qui empêche la transduction du signal et prévient l'accession d'IL-1 $\beta$  et d'IL-1 $\alpha$  au récepteur IL-1RI (Dinarello, 1991).

Au sein du SNC, l'IL-1 $\beta$  est capable d'induire des changements neuro-inflammatoires de grande ampleur. Elle stimule précocement l'activation astrocytaire et microgiale et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, et induit l'activation de la voie des eicosanoïdes (Basu et coll., 2004). Au sein du SNC, l'IL-1 peut provenir de la périphérie ou être produite localement par les cellules résidentes du SNC, majoritairement par les cellules microgiales (Allan et coll., 2005). L'IL-1RI est exprimé sur toutes les cellules résidentes du SNC et peut générer une multitude d'actions (Allan et coll., 2005) pouvant avoir un rôle dans les mécanismes épileptiques (Rijkers et coll., 2009).

### ***a. Impact sur l'excitabilité neuronale***

Les mécanismes d'action semblent complexes et multiples. L'IL-1 $\beta$  module la neurotransmission, en inhibant la recapture du Glu par les astrocytes (Ye et coll., 1996), et en augmentant sa libération neuronale (Kamikawa et coll., 1998). L'IL-1 $\beta$  interagit à l'échelle moléculaire avec certains récepteurs glutamatergiques, aboutissant à une augmentation de

leur fonctionnement (Lai et coll., 2006 ; Viviani et coll., 2003). L'IL-1 $\beta$  intervient également dans la transmission GABAergique (Wang et coll., 2000; Zeise et coll., 1997).

La plupart des expérimentations suggèrent un rôle pro-épileptogène de l'IL-1 $\beta$ . En effet, l'application cérébrale d'IL-1 $\beta$  chez le rongeur précipite la survenue des crises convulsives provoquées par l'injection intracérébrale de KA et prolonge leur durée (Vezzani et coll., 1999). De plus, l'injection d'IL-1Ra induit des effets anticonvulsivants puissants. Les souris transgéniques surexprimant l'IL-1Ra astrocytaire ont une susceptibilité diminuée aux crises (Vezzani et coll., 2000). Ceci indique qu'une augmentation endogène d'IL-1 $\beta$  dans le cerveau contribue à la maintenance des crises dans ces modèles. Confortant ce point de vue, l'inhibition de la production endogène d'IL-1 $\beta$  (par inhibition de la caspase-1 ou par extinction de son gène) réduit significativement les crises (Ravizza et coll., 2006).

Cependant, la plupart des modèles d'épilepsie étudiés sont liés à des phénomènes neurodégénératifs et il se peut que l'IL-1 $\beta$  exerce ses actions sur l'excitabilité neuronale en modulant les phénomènes neurotoxiques (Rijkers et coll., 2009).

### ***b. Impact sur les conséquences neuropathologiques***

Le rôle de l'IL-1 dans la régulation neuro-inflammatoire suggère son implication dans la cascade neuropathologique. L'expression d'IL-1 $\beta$  augmente rapidement dans les modèles animaux d'ischémie, de TC, d'hypoxie et suite à l'exposition à des neurotoxiques (Harry et coll., 2002; Minami et coll., 1992 ; Taupin et coll., 1993). Ces pathologies aboutissent toutes à des phénomènes neurodégénératifs. De plus, l'injection intracérébrale d'IL-1Ra recombinante 10 min avant puis 10 min après l'injection de KA protège les neurones de toutes les aires hippocampiques des dommages induits par le KA, et ceci de manière dose-dépendante (Panegyres et Hughes, 1998). Cette protection a lieu sans effet de l'IL-1Ra ni sur la sévérité ou la durée des crises, ni sur les fonctions physiologiques comme la pression

sanguine ou la température corporelle. Ces résultats suggèrent un rôle de l'IL-1 endogène dans la modulation de la mort neuronale associée aux crises.

### ***III.1.3.L'interleukine-6 et la régulation du signal cytokinique***

L'IL-6 appartient à une famille cytokinique comprenant notamment l'IL-11, le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) et le facteur inhibiteur leucémique (LIF). Cette famille est définie par un mode de transduction du signal commun faisant intervenir une glycoprotéine transmembranaire particulière de 130 kDa, gp130. L'IL-6 est synthétisée sous forme d'un précurseur, puis libérée par protéolyse. Elle produit ses multiples effets par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, l'IL-6R. Le complexe IL-6/IL-6R induit l'homodimérisation de la sous-unité transductrice du signal, gp130 et conduit à l'activation des Janus kinases (JAK) et de composants intracellulaires impliquant les protéines transductrices du signal et activatrices de transcription (STAT) et certaines protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK ; Carpenter et O'Neill, 2009).

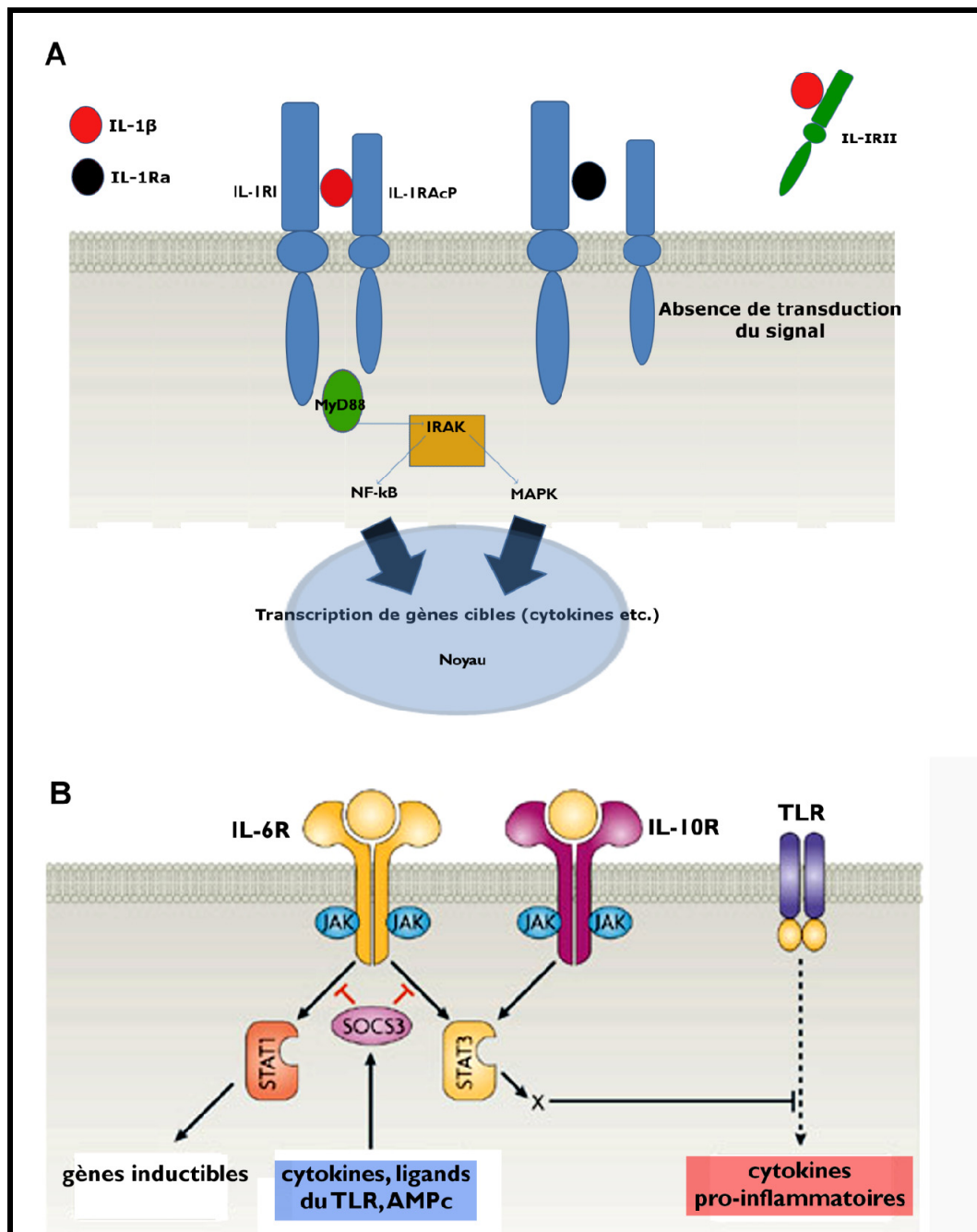
L'IL-6 est une cytokine douée de fonctions pléiotropiques puissantes, lui permettant de jouer un rôle dans l'initiation de la réponse inflammatoire, de réguler celle-ci dans sa phase aiguë et d'orchestrer la neuro-inflammation centrale (Viviani et Marinovich, 2004). Les astrocytes sont la source principale d'IL-6 dans le SNC et cette cytokine promeut la prolifération astrocytaire et la survie neuronale (Kielian et Drew, 2005). Ceci est appuyé par l'observation de souris mutantes déficientes en IL-6 qui montrent une astrogliose diminuée à la suite d'une lésion focale (Penkowa et coll., 1999) ou d'un SE induit par le KA (Penkowa et coll., 2001).

Le seuil et les réponses spécifiques induites par le signal cytokinique sont régulés par de nombreux mécanismes impliquant les tyrosines phosphatases, l'internalisation de récepteurs, la présence de récepteurs solubles détournant le ligand ou encore des inhibiteurs spécifiques



comme les protéines suppressives du signal cytokinique (SOCS). La famille des SOCS contient au moins sept membres, SOCS1-7, capables de réguler négativement la voie des JAK/STAT, une voie de signalisation impliquée très fréquemment dans la transduction du signal cytokinique (Campbell, 2005). L'expression des SOCS est généralement induite par l'action de cytokines sur leurs récepteurs spécifiques et permet d'interférer avec le signal inducteur, mais également avec la signalisation induite par d'autres cytokines, en inhibant directement l'activité enzymatique des JAK (Figure 8B). En particulier, SOCS3 est rapidement transcrite par la stimulation cytokinique, et l'ARNm de SOCS3 est donc un marqueur effectif de la transduction du signal cytokinique, induit par l'IL-6 notamment (Crocker et coll., 2003). En raison de l'importance de l'IL-6 dans la mise en place des processus inflammatoires, SOCS3 détient un rôle clé dans la progression et l'intensité de ces phénomènes. Cela a été confirmé par l'étude de délétion conditionnelle du gène SOCS3 chez la souris, qui entraîne le décès à l'âge adulte en raison de lésions inflammatoires dans les cavités péritonéales et pleurales (Croker et coll., 2004 ; Robb et coll., 2005).

Figure 8. La transduction du signal cytokinique et sa régulation. Exemples d'IL-1 et d'IL-6



(A), le système de l'interleukine-1 (IL-1) : l'IL-1 peut se lier à deux types de récepteur : le récepteur de type I (IL-1RI) et de type II (IL-1RII). Seul l'IL-1RI, complexé avec l'IL-1RAcP (*IL-1 receptor accessory protein*), peut induire une signalisation intracellulaire par le biais de la protéine de différenciation myéloïde 88 (MyD88) et d'une protéine kinase (l'*IL-1 receptor associated kinase*, IRAK). Une cascade d'activation aboutit au recrutement de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) et au facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) qui induisent la transcription de gènes cibles. Le récepteur soluble, IL-1RII, qui capture l'IL-1 ou l'IL-1Ra, un antagoniste endogène, ne permet pas la transduction intracellulaire du signal IL-1 ; d'après Watters et coll. (2007). (B), régulation du signal cytokinique par la protéine suppressive du signal cytokinique 3 (SOCS3). SOCS3 est induite notamment par la fixation d'IL-6 sur son récepteur (IL-6R) et supprime l'activation de STAT1 et STAT3, ce qui inhibe l'induction de cytokines pro-inflammatoires par l'IL-6 ou les ligands du *Toll-like receptor* (TLR), comme le lipopolysaccharide bactérien, un inducteur neuro-inflammatoire (voir page 196) ; d'après Yoshimura et coll. (2007).

## **III.2. La voie des eicosanoïdes**

### ***III.2.1. Généralités***

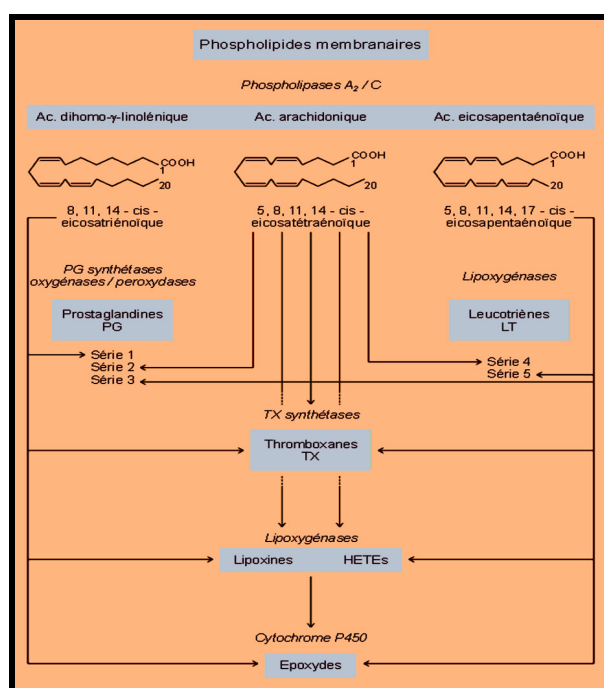
L'acteur central de la voie des eicosanoïdes est représenté par l'acide arachidonique (AA), un acide gras libéré par hydrolyse des phospholipides des membranes cellulaires, notamment par l'action des phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), une superfamille d'enzymes cytosoliques et sécrétées (Schaloske et Dennis, 2006). L'oxygénation enzymatique de l'AA par les cyclo-oxygénases (COX), les lipo-oxygénases et par l'action mono-oxygénasique du cytochrome P450 permet la production d'eicosanoïdes, qui sont des lipides bioactifs, agissant par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Les composants majeurs de ce groupe sont les prostaglandines (PG), le thromboxane et les leucotriènes (Figure 9). Ces composés jouent un rôle majeur dans divers systèmes du corps humain (cardiovasculaire, rénal, gastro-intestinal et neuronal) et sont des médiateurs puissants de l'inflammation (Farooqui et coll., 2007). La plupart des molécules anti-inflammatoires actuelles (aspirine, ibuprofène, coxibs) agissent en bloquant la formation ou les effets des eicosanoïdes. Au sein du SNC et dans des conditions pathologiques diverses, l'activation des systèmes enzymatiques impliqués dans la voie des eicosanoïdes produit une situation neuro-inflammatoire *via* leur participation à des phénomènes de vasodilatation, d'agrégation plaquettaire, de chimiotactisme leucocytaire ou de libération de cytokines. L'augmentation de la synthèse de PG a été observée au cours de nombreuses pathologies ayant une composante inflammatoire (Bazan et coll., 2002 ; Katsuki et Okuda, 1995 ; Yermakova et O'Banion, 2000).

### ***III.2.2. La libération d'acide arachidonique par les phospholipases A<sub>2</sub>***

Les cellules de mammifères contiennent de très nombreuses enzymes lipolytiques, en particulier de nombreuses formes de phospholipases catalysant l'hydrolyse des phospholipides membranaires. Plus précisément, les phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) catalysent

spécifiquement l'hydrolyse de la liaison acyl-ester à la position *sn*-2 des 1,2-diacyl-3-*sn*-phosphoglycérides, induisant la libération d'un acide gras et de lysophospholipides (Figure 9). Pas moins de 20 PLA<sub>2</sub> ont été identifiées dans différents tissus de mammifères (Kudo et Murakami, 2002). Elles sont généralement classées en trois familles selon leur dépendance catalytique au calcium, en type Ca<sup>2+</sup>-dépendant cytosolique (cPLA<sub>2</sub>) ou sécrétée (sPLA<sub>2</sub>) et en type Ca<sup>2+</sup>-indépendant (iPLA<sub>2</sub>) (Akiba et Sato, 2004). Ces divers groupes de PLA<sub>2</sub> sont présents au sein du SNC (Kinsey et coll., 2005 ; Molloy et coll., 1998 ; Sun et coll., 2004), mais leur grande diversité a rendu la compréhension de leurs actions délicate, notamment en raison de l'absence d'inhibiteurs spécifiques. Dans les neurones, l'activation des cPLA<sub>2</sub> pourrait être liée à l'activité excitatrice glutamatergique (Taylor et Hewett, 2002).

**Figure 9. Synthèse des eicosanoïdes**



Différents phospholipides membranaires sont spécifiquement métabolisés par les phospholipases A<sub>2</sub> ou C. L'acide arachidonique (AA) est l'un des deux acides gras les plus importants dans les membranes excitables. La formation de prostaglandines (PG) est effectuée par des PG synthétases (ou cyclo-oxygénases, COX) à partir d'AA. D'autres voies métaboliques de l'AA permettent la formation de leucotriènes, de thromboxanes et de lipoxines notamment ; d'après Farooqui et Horrocks (2007).

### ***III.2.3. La synthèse de prostaglandines par les cyclo-oxygénases***

L'AA est susceptible de donner naissance à de nombreux composés d'oxydation, soit par voie enzymatique soit par voie non enzymatique (Figure 9). Les COX sont des enzymes bifonctionnelles à noyau hème occupant une place centrale au sein du métabolisme de l'AA. Elles possèdent deux centres catalytiques couplés fonctionnellement (Smith et Song, 2002) : un centre cyclo-oxygénasique formant l'hydroxy-endopéroxyde PGG<sub>2</sub>, et un centre peroxydasique qui réduit la PGG<sub>2</sub> en PGH<sub>2</sub>.

Deux gènes distincts, COX-1 et COX-2, ont été identifiés et caractérisés et codent pour deux isoformes polypeptidiques de 70 kDa. COX-1 et COX-2 sont des homodimères positionnés au sein des membranes du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire. Elles possèdent des propriétés structurale et catalytique équivalentes. COX-3 est une troisième isoforme, spécifique du tissu cérébral. Il s'agirait en fait d'un variant d'épissage de COX-1 et son rôle n'est pas clairement déterminé (Davies et coll., 2004). Malgré leur grande homologie structurale et fonctionnelle, COX-1 et COX-2 montrent des différences dans leur régulation génique (Harper et Tyson-Capper, 2008).

Dans le SNC, COX-1 est exprimée constitutionnellement dans les neurones et les cellules gliales. De même, et contrairement aux autres tissus, COX-2 est également exprimée de façon basale dans le SNC, majoritairement au sein des neurones (Samad et coll., 2001). Au sein de l'hippocampe, COX-2 est observée dans le GD et les couches CA1 à CA3 où elle semble être colocalisée avec les neurones glutamatergiques (Kaufmann et coll., 1996). Les astrocytes et les cellules microgliales peuvent également exprimer COX-2 en réponse à un stimulus inflammatoire (Choi et coll., 2003 ; Hirst et coll., 1999).

Les COX sont fonctionnellement couplées aux cPLA<sub>2</sub> ainsi qu'aux enzymes de synthèse des autres PG, permettant la formation de PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> et PGF<sub>2α</sub> (Figure 9). Ces molécules

agissent ensuite *via* la fixation à des récepteurs à 7 hélices transmembranaires couplés aux protéines G (Kobayashi et Narumiya, 2002).

***a. Activation de la voie des eicosanoïdes dans les modèles de crises épileptiques et d'épileptogénèse***

Comme l'ont démontré de nombreuses études, les crises épileptiques expérimentales induisent l'expression et activent la cPLA<sub>2</sub> aboutissant au relargage d'AA (Farooqui et coll., 2006). Des études menées après un SE induit pharmacologiquement chez l'animal ont montré la surexpression cérébrale de COX-2 (Cole-Edwards et Bazan, 2005 ; Kawaguchi et coll., 2005 ; Turrin et Rivest, 2004). L'induction de COX-2 semble être régulée par une voie dépendante de l'activité neuronale puisqu'elle est maximale dans les minutes qui suivent le SE, disparaît durant la période d'épileptogénèse et est activée durant la récurrence des crises dans un modèle de SE induit électriquement chez le rat (Holtman et coll., 2009). L'importance de l'induction de COX-2 dans la maladie épileptique est renforcée par l'augmentation de son expression dans le tissu épileptique humain de patients atteints d'EPLT (Desjardins et coll., 2003).

***b. Action pro- ou anti-épileptogène ?***

L'augmentation de l'expression de COX-2 aboutit à l'augmentation de PG, aux effets variés et parfois antagonistes, pouvant expliquer l'absence de consensus sur le rôle de la régulation d'expression des enzymes de la voie des eicosanoïdes.

L'inhibition de COX-2 après l'induction du SE semble neuroprotectrice (Chen et coll., 1995 ; Jung et coll., 2006 ; Kawaguchi et coll., 2005 ; Kunz et Oliw, 2001), mais une aggravation des événements neurodégénératifs a également été décrite dans ces conditions (Kim et coll., 2008). Lorsqu'un inhibiteur de COX-2 est appliqué avant le SE, une aggravation des crises est constatée (Baik et coll., 1999 ; Gobbo et O'Mara, 2004 ; Kim et

coll., 2008). La période d'administration de l'inhibiteur semble donc avoir un rôle majeur dans son action dans les modèles post-SE, peut être en raison des actions antagonistes des PG dont la formation est ainsi bloquée (Oliveira et coll., 2008).

L'action de COX-2 sur le processus d'épileptogenèse n'aboutit pas à un consensus en raison de la multiplicité des molécules formées, à leur durée d'action variable et leurs propriétés intrinsèques (pro- ou anti-ictogène) différentes. Les études expérimentales ont ainsi aboutit à des résultats contradictoires.

Pour l'heure, deux études se sont intéressées à l'effet d'une inhibition de COX-2 sur l'épileptogenèse. La première suggère un effet anti-épileptogène mineur associé à une faible neuroprotection lorsqu'un inhibiteur de COX-2, le *celecoxib*, était administré durant la période d'épileptogenèse dans le modèle pilocarpine chez le rat (Jung et coll., 2006). Dans la seconde étude, aucun effet notable n'a été constaté dans un modèle post-SE induit électriquement (Holtman et coll., 2009).

## **Chapitre IV**

### **Questions abordées**



**Notre premier travail a consisté à vérifier si une hypercholinergie provoquée par l'administration locale d'un inhibiteur des ChE, le soman, au niveau de l'hippocampe était susceptible d'induire l'installation d'un processus d'épileptogenèse (Étude I, page 63).** Comme exposé dans les chapitres précédents, le choix de l'hippocampe a été guidé par sa richesse en récepteurs cholinergiques, par sa propension à être le siège de synchronisation neuronale et à montrer des remaniements structuraux importants lors du développement épileptique, en particulier chez l'adulte atteint d'EMLT. Dans ce nouveau modèle expérimental, nous avons voulu aborder différentes questions : les paroxysmes sont-ils restreints à l'hippocampe ou impliquent-ils d'autres régions ? Des mécanismes neuro-inflammatoires (cellulaires et moléculaires) peuvent-ils être mis en évidence suggérant leur implication dans l'épileptogenèse ? Des altérations neuropathologiques qui ressembleraient à celles observées dans certains modèles animaux d'EMLT (bourgeonnement des fibres moussues ; dégénérescence sélective de certaines couches cellulaires ; dispersion des cellules granulaires du GD) peuvent-elles être identifiées ?

**Le deuxième travail a exploré la réaction neuro-inflammatoire (cellulaire et moléculaire) dans un modèle expérimental d'EMLT : la micro-injection intrahippocampique de KA chez la souris (Étude II, page 108).** Ces expérimentations devaient permettre de mieux caractériser le processus inflammatoire dans cette pathologie particulière. A terme, les résultats obtenus pourraient fournir une base descriptive importante à toutes futures études visant à déterminer si la neuro-inflammation est simplement une conséquence des crises et des altérations morphologiques initiales, ou un composant étiologique de l'épilepsie contribuant à l'installation de la maladie épileptique.

**Le troisième travail, purement méthodologique, a évalué l'influence du processus d'épileptogenèse, provoquée par la micro-injection intrahippocampique de KA chez la souris, sur la stabilité des gènes de référence utilisés en RT-qPCR (Étude III, page 139).**

Cette méthode, utilisée dans les deux études précédentes, permet l'analyse quantitative des modifications géniques par réaction de polymérisation en chaîne couplée à une étape de transcription inverse. Elle nécessite l'utilisation de gènes de référence qui doivent être exprimés de façon stable dans les conditions expérimentales, ce qui n'a jamais été vérifié dans les études sur l'évolution du processus épileptique (SE, épileptogenèse, récurrence des crises).

*- Section B -*

*Travaux expérimentaux*

---

## **Étude I**

### **Potentiel épileptogène de l'injection intrahippocampique de soman chez la souris**

## **I. Introduction et objectifs**

Comme rappelé dans la section précédente, l'ACh est un neurotransmetteur fondamental du SNC sain. L'ACh est également impliquée dans des processus pathologiques comme l'épilepsie. En effet, la stimulation muscarinique directe par la pilocarpine administrée en périphérie induit un SE (Honchar et coll., 1983 ; Turski et coll., 1989 ; Turski et coll., 1983a). Son administration intrahippocampique produit également un SE, des changements neurochimiques majeurs, dont une augmentation de la concentration en Glu (Smolders et coll., 1997; Smolders et coll., 2004), ainsi que des crises récurrentes durant la période d'observation de 30 j (Furtado et coll., 2002).

L'intoxication systémique par les NOP du type soman, de puissants inhibiteurs des ChE, entraîne aussi des crises épileptiques où l'initiation cholinergique est suivie d'une hyperglutamatergie responsable du maintien des crises et de l'apparition des lésions cérébrales par excitotoxicité (Lallement et coll., 1991 ; McDonough et Shih, 1997). Une seule étude par McDonough et coll. (1987) a été réalisée à ce jour utilisant le soman (11 nmol) en injection intrahippocampique chez le rat. Dans cette étude, les auteurs montrent que la micro-injection de soman n'induit pas de SE au cours des 6 h d'observation. Cependant, la possibilité qu'une épiléptogénèse puisse prendre place ultérieurement n'a pas été vérifiée.

### **Objectifs**

**L'administration intrahippocampique de soman peut-elle :**

**1) déclencher un processus d'épileptogénèse ?**

**2) provoquer des conséquences histopathologiques et neuro-inflammatoires ?**

**3) induire des modifications comportementales fonctionnelles ?**

## II. Protocoles d'étude

### II.1. Étude de la dose 11 nmol

L'ensemble des expérimentations a été réalisé chez la souris de souche C57BL/6. La dose de 11 nmol a été choisie comme dose initiale. C'est cette dose qui a été utilisée chez le rat dans la seule étude d'injection intrahippocampique de ce toxique disponible dans la littérature ouverte (McDonough et coll., 1987). Dans notre étude, l'équipement en électrodes EEG et l'injection intrahippocampique de soman ont été réalisés sous anesthésie à l'hydrate de chloral (voir Section C, 164).

Cinq des sept animaux injectés avec cette dose sont morts dans les 24 h qui suivaient l'injection (voir Résultats, page 75) ; nous avons donc fourni une protection périphérique par l'injection d'un antagoniste muscarinique qui ne franchit pas la BHE, le nitrate de méthyl-atropine (NMA, 200 µL, 4 mg/kg, ip ; page 186) à un autre groupe de 17 animaux.

Trois animaux ont été enregistrés à l'EEG immédiatement après le réveil post-anesthésique et durant les 48 h suivantes (avec NMA, n=3). Afin d'évaluer les variations EEG à long terme, nous avons enregistré l'EEG pendant 24 h au cours de la première, deuxième et quatrième semaine faisant suite à l'injection chez des souris qui avaient ou non reçu du NMA (sans NMA, n=2 ; avec NMA, n=7). Deux animaux témoins (TEM) ont été enregistrés de la même façon.

L'analyse histologique a été effectuée chez tous les animaux à la fin de la dernière séance d'enregistrement EEG (30 j post-injection, n=9). Après perfusion-fixation des cerveaux, des coupes sériées de la région hippocampique (~0 à -3 mm à partir du bregma selon l'axe rostro-caudal ; (Paxinos et Franklin, 2001) ont été colorées à l'hémalun-phloxine (H&P) pour l'étude des processus neurodégénératifs (voir page 175). Sur les autres coupes, les cellules microgliales ont été marquées à la lectine GSA-IB4 et les astrocytes par immunohistochimie

de la GFAP. D'autres animaux n'ayant pas été équipés pour l'expérimentation EEG mais montrant les mêmes signes d'intoxication (voir Résultats, page 75), ont également été analysés 48 h (n=4), 3 j (n=3) et 30 j (n=2) après l'injection.

Deux animaux intoxiqués par le soman ont été sacrifiés 6 mois après l'injection pour une analyse morphologique complémentaire des cellules neuronales de l'hippocampe par méthode d'imprégnation argentique de Golgi sur coupes épaisses (voir page 193). La conception de l'étude est schématisée Figure 10.

## **II.2. Étude dose-effet (4 ; 2,8 ; 2 ; 1 ; 0,75 et 0,53 nmol)**

D'après le passage suggéré du toxique dans le sang faisant suite à la dose de 11 nmol (voir Résultats, page 75), une étude avec des doses inférieures a été initiée afin de tenter de limiter l'effet du toxique au niveau de la structure hippocampique.

Dans cette étude, les points analysés ont été (i) les variations EEG à long terme et (ii) le passage systémique du toxique (voir Figure 10). Les animaux ont été traités avec différentes doses de soman (4 ; 2,8 ; 2 ; 1 ; 0,75 et 0,53 nmol ; n=4, 4, 3, 8, 4 et 4, respectivement) ou avec le solvant (sérum physiologique ; TEM, n=4).

L'inhibition des ChE sanguines a été déterminée 30 min avant l'injection pour le niveau basal, et 1 h après (voir page 186). L'EEG de chaque animal a été enregistré régulièrement durant des sessions de 24 h, répétées au moins deux fois, durant la première, deuxième, quatrième, huitième et douzième semaine suite à l'injection. Les caractéristiques de l'analyse EEG sont consignées page 168. Pour chacune de certaines doses (4, 2, 1 et 0,75 nmol), l'EEG d'un animal a également été enregistré pendant 24 h dès le réveil post-anesthésique.

A la fin de la dernière session d'enregistrement (12<sup>ème</sup> semaine post-injection), une analyse histologique sur tissu fixé a été effectuée sur les souris survivantes (soman, n=21 ; TEM,

n=4). Dans le but d'initier une comparaison des données histologiques avec celles obtenues par ailleurs après l'injection intrahippocampique de KA (Bouilleret et coll., 1999 ; Riban et coll., 2002), des coupes issues de souris injectées avec le soman et ayant présenté des décharges EEG paroxystiques, ont été analysées 21 j suite à l'administration du toxique (4 ; 2,8 ; 2 et 1 nmol ; n=1 par dose). Après perfusion-fixation des cerveaux, des coupes sériées de la région hippocampique ont été traitées comme dans l'étude précédente (H&P, GSA-IB4, GFAP). La visualisation des neurones au sein de l'hippocampe a été effectuée par détection immunohistochimique de la protéine NeuN (voir page 176).

Une expérimentation préliminaire a consisté en l'analyse des fibres moussues hippocampiques sur des coupes de cerveaux d'animaux injectés avec le soman (4 nmol, n=3 ; 2 nmol, n=2 ; 1 nmol, n=3 ; 0,75 nmol, n=1 et 0,53 nmol, n=1) par une coloration de Timm (voir page 176) et un marquage immunohistochimique au ZnT<sub>3</sub>.

### **II.3. Étude des modifications électro-encéphalographiques initiales et d'expression ARNm de marqueurs neuro-inflammatoires (4 et 1 nmol)**

L'étude précédente nous ayant permis de mettre en évidence un phénomène d'épileptogenèse suite à la micro-injection de soman (voir Résultats, page 80), nous avons choisi de poursuivre en comparant les événements EEG initiaux et les variations d'expression d'ARNm de marqueurs inflammatoires provoqués par deux doses induisant une épilepsie chronique (4 et 1 nmol, voir Tableau 2).

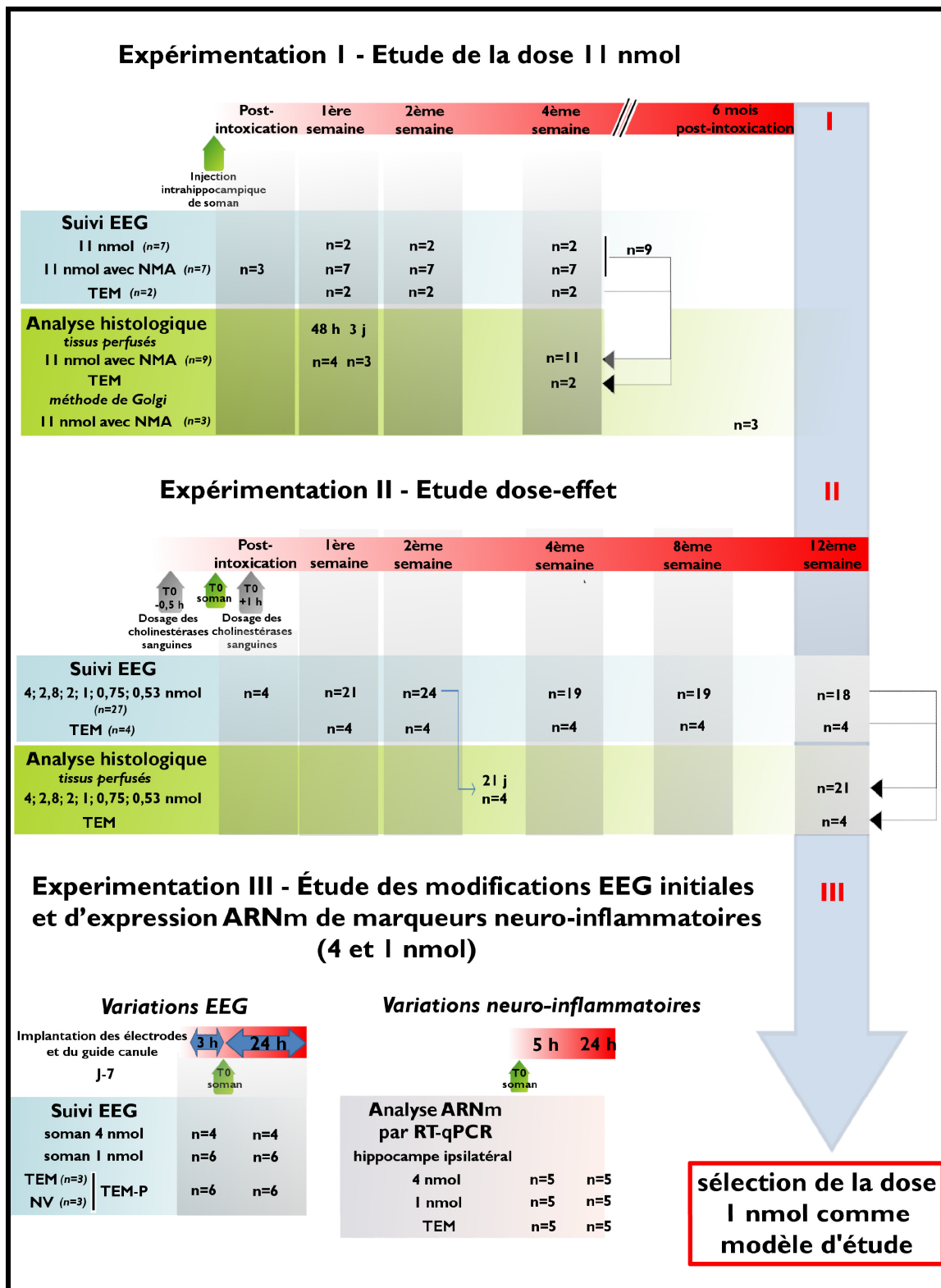
Pour l'étude des variations EEG initiales, une anesthésie plus courte que celle fournie par l'hydrate de chloral a été nécessaire au moment de l'injection du soman. Ceci a entraîné une modification du protocole d'injection (voir Section C, page 185) : une semaine avant l'injection, 16 souris ont été implantées unilatéralement avec un guide canule au-dessus de la dure-mère, ainsi qu'avec des électrodes, sous anesthésie lourde délivrée par l'hydrate de



chloral. Le jour de l'injection, l'activité EEG basale a été déterminée pendant les 3 h précédant l'injection intrahippocampique. Les souris ont ensuite été brièvement et légèrement anesthésiées par un mélange halothane/O<sub>2</sub>, puis traitées par le soman (4 et 1 nmol ; n=4 et 6, respectivement) ou le sérum physiologique (TEM, n=3). D'autres souris n'ont reçu aucune injection intrahippocampique (naïves, NV, n=3). Suite à l'injection, l'EEG a été enregistré de façon continue pendant 24 h. Les bandes de fréquences ont été déterminées comme suit :  $\delta$  (0,5-3,5 Hz),  $\theta$  (4,0-7,5 Hz),  $\alpha$  (8,0-13,5 Hz),  $\beta$  (14,0-30,0 Hz) et  $\gamma$  (30,5-50,0 Hz). La réponse des trois souris TEM n'a pas différée de celle des trois souris NV. Ces six souris ont été réunies dans le même groupe (TEM-P). L'analyse statistique des variations du spectre EEG moyen est décrite page 197.

Une autre expérimentation consistant en une analyse RT-qPCR de certains marqueurs inflammatoires a été effectuée sur ces deux doses d'étude afin d'étudier les variations neuro-inflammatoires au sein de l'hippocampe ipsilatéral. Les médiateurs moléculaires sélectionnés ont été IL-1 $\beta$ , SOCS3, cPLA<sub>2</sub> et COX-2 en raison de leur importance potentielle dans l'épileptogénèse (voir page 47). Après la micro-injection de soman (4 et 1 nmol) ou de sérum physiologique (TEM), une analyse ARNm sur tissu frais (voir page 171) de l'hippocampe ipsilatéral a été effectuée 5 et 24 h après l'injection (n=5 par groupe). Les procédures d'extraction et d'analyse ARNm sont détaillées pages 171 et 179.

Figure 10. Conception de l'étude et démarche méthodologique aboutissant au choix du modèle d'épileptogenèse induite par une dérégulation cholinergique focale (1 nmol)



## **II.4. Caractérisation de la dose 1 nmol**

L'ensemble des expérimentations précédentes nous a conduit à la sélection d'un modèle d'étude de l'épileptogenèse initiée par une dérégulation cholinergique focale : la dose de 1 nmol nous a paru la plus intéressante parce qu'elle entraînait un processus d'épileptogenèse, un faible passage périphérique du toxique et des changements fins et transitoires du spectre EEG (voir Résultats, pages 75-88).

### ***II.4.1. Caractérisation de la diffusion cérébrale du toxique***

La diffusion du soman dans le cerveau a été analysée à l'aide d'une approche histochimique des ChE sur tissu frais (voir page 193) 30 min, 1, 3, 5, 12 et 24 h après l'injection de soman (n=2-4 par temps, total de 18 animaux ; Figure 11) ou 1 et 3 h après l'injection de sérum physiologique (TEM, n=2 par temps).

### ***II.4.2. Caractérisation de l'activation neuronale et détection des événements neurodégénératifs***

Afin d'évaluer l'activation neuronale et les événements neurodégénératifs, des animaux ont été sacrifiés 2, 5, 12 h, 1, 2, 3, 7, 14 et 28 j après l'injection de soman ou de sérum physiologique (TEM) (n=2-4 par temps pour chaque groupe, total de 40 animaux ; Figure 11). Sur des coupes flottantes de tissus perfusés-fixés (voir page 177), l'activation neuronale a été détectée par l'immunohistochimie de la protéine Fos et les événements neurodégénératifs ont été évalués par marquage argentique.

### ***II.4.3. Études comportementales lors de la phase chronique***

L'injection intrahippocampique de 1 nmol de soman, en dépit de la constitution d'un processus d'épileptogenèse ne produit que très peu de signes cliniques initiaux et des

modifications électrophysiologiques modérées. Nous souhaitons ainsi voir si des déficits neurologiques peuvent être mis en évidence comme dans le cas d'autres modèles d'épilepsie (Karhunen et coll., 2007 ; Karhunen et coll., 2006 ; Kemppainen et coll., 2006; Narkilahti et coll., 2003 ; Santos et coll., 2000). Les souris ont ainsi été soumises à une analyse comportementale sur une batterie de tests, 60 j après la micro-injection de sérum physiologique (TEM) ou de soman (1 nmol), temps pour lequel des crises EEG récurrentes ont été détectées (voir Tableau 2). Trois types d'expérimentations ont été effectués sur des groupes séparés de souris (15 souris par condition (TEM ou soman) et par expérience).

#### ***a. Coordination motrice et mémoire spatiale***

La performance locomotrice a été évaluée sur un cylindre rotatif (rotarod) 1, 2, 3, 6, 9, 13, 20, 27, 34, 48 et 60 j après l'injection intrahippocampique. Ce test très simple permet, grâce à la détermination de la vitesse du cylindre entraînant la chute de l'animal, de déterminer l'impact du traitement sur la coordination motrice. Les procédures de ce test sont détaillées page 187.

A la fin de la dernière session de rotarod (60 j post-injection), la mémoire spatiale des souris des deux groupes (TEM et soman) a été évaluée à l'aide d'un labyrinthe de Morris. L'objectif de ce test est d'évaluer les capacités à mémoriser et à gérer l'information spatiale dans une situation aversive. Ce test repose sur une tendance naturelle présentée par la souris qui, dans un environnement stressant et confiné, tente de s'en échapper. La tâche consiste pour l'animal à localiser une plate-forme « refuge », rendue invisible par immersion dans un bassin rempli d'eau opacifiée. Le point de départ étant modifié à chaque essai, l'animal ne peut pas adopter une stratégie consistant en une trajectoire stéréotypée, et est ainsi capable, au fur et à mesure des séances, de localiser la plateforme indépendamment de son point de départ, à partir des seules informations environnementales représentées par des repères

visuels placés sur la paroi du bassin. La *performance d'apprentissage* est mesurée par le temps nécessaire pour atteindre la plateforme.

Afin d'évaluer la *mémorisation spatiale* des animaux après la phase d'apprentissage, la plateforme a été retirée et chaque animal a été placé dans la piscine. Si l'animal a présenté une nette préférence à nager dans le quadrant contenant antérieurement la plateforme, on considère qu'il y a eu mémorisation spatiale. Pour ce faire, le temps passé par l'animal dans chacun des quadrants ainsi que le nombre de fois où l'animal est passé à l'endroit où se trouvait la plateforme ont été mesurés. Les procédures de ce test sont détaillées page 188.

### ***b.Mémoire de travail et anxiété***

La mémoire de travail a été analysée dans un labyrinthe en T, dont les caractéristiques sont détaillées page 188. Le test repose sur la tendance naturelle des rongeurs à entrer alternativement dans l'un ou l'autre bras d'un labyrinthe lorsqu'ils sont testés de manière répétée. On nomme cela le comportement d'alternance spontanée (AS) ; ce test est donc réalisé sans conditionnement ni privation alimentaire. La performance des animaux du groupe TEM (n=15) et soman (n=15) a été estimée par le pourcentage de première alternance (calculée sur les deux premières sessions) et par le pourcentage d'alternance totale calculé sur les six sessions successives et exprimé en pourcentage du taux d'alternance maximal de 100 %.

L'anxiété a été évaluée chez la souris à l'aide d'un labyrinthe en croix surélevé. Ce test est basé sur la préférence des rongeurs pour les espaces fermés et sombres, par rapport aux espaces ouverts et éclairés qu'ils ressentent comme aversifs. La tendance spontanée des souris à l'exploration, malgré l'anxiété que cela leur cause, les conduit à s'aventurer dans les bras ouverts du labyrinthe (voir page 191). Plus un animal est anxieux, plus il restera dans les bras fermés. Les paramètres mesurés ont été : (i) le temps passé dans le bras ouvert (TBO) et

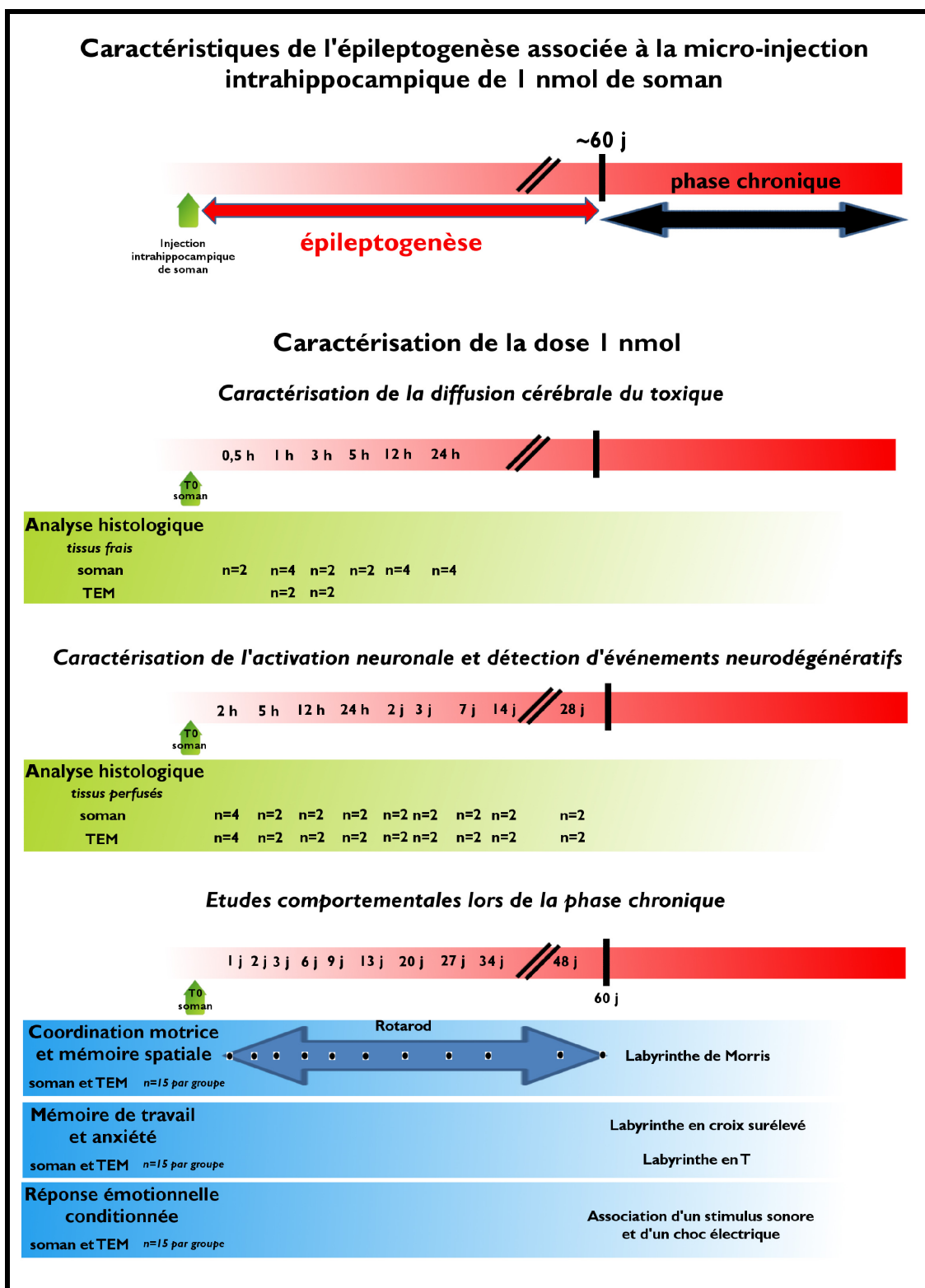
dans le bras fermé (TBF). Le rapport TBO/(TBO+TBF) est considéré comme un index d'anxiété (plus cet index est élevé, et moins l'animal est anxieux) ; et (ii) le nombre d'entrées dans le bras fermé : ce paramètre est un index de la performance locomotrice des souris qui permet de contrôler l'absence de biais lié à la locomotion des animaux.

### ***c. Réponse émotionnelle conditionnée***

La réponse émotionnelle conditionnée (REC) est déterminée en soumettant un rongeur à un stimulus « neutre » auditif, sans signification de danger naturel pour l'animal, appelé stimulus conditionnant (*conditioned stimulus*, CS) quelques secondes avant un stimulus aversif (un choc électrique au niveau des pattes dans notre expérimentation), appelé stimulus non conditionnant (*unconditioned stimulus*, US). Le rongeur montre alors un comportement naturel de défense : il devient immobile (*freezing*). Après ce couplage CS-US, l'animal associe le stimulus neutre et le stimulus aversif. En conséquence, le CS seul induit les réactions de peur innée, dont le *freezing*. Ce processus est dénommé **REC auditive**. Un point important est que l'environnement particulier où a eu lieu l'association CS-US acquiert lui aussi une signification aversive, et le seul fait de replacer l'animal dans l'environnement de l'association CS-US déclenche une réaction de peur innée, dénommée **REC contextuelle**. La REC auditive et contextuelle a ainsi été évaluée par le temps passé en situation de *freezing* par la souris des deux groupes d'étude (TEM et soman ; n=15 par groupe) suivant les protocoles détaillés page 192.

L'intérêt de ce test est que la réaction de peur conditionnée fait intervenir des circuits cérébraux définis : les noyaux amygdaliens sont considérés comme les structures majoritairement sollicitées dans les mécanismes de peur conditionnée en intégrant les informations auditives et contextuelles ; l'hippocampe semble lui plus spécifique du développement de la REC contextuelle (Ollat, 2001).

Figure 11. Description du modèle d'épileptogénèse induit par l'injection intrahippocampique de 1 nmol de soman



### III. Résultats

#### III.1. Étude de la dose 11 nmol

##### *III.1.1. Conséquences pathophysiologiques*

Deux à trois minutes après la fin de l'injection, tous les animaux (n=24) ont rapidement montré des signes sévères d'intoxication, notamment une forte dépression respiratoire, associant une augmentation de l'amplitude des mouvements respiratoires et un ralentissement de leur fréquence. Une élévation associée à un tournoiement de la queue très caractéristique (environ 6 cycles par min) a également été constatée (Figure 12). Une salivation excessive a été notée chez quelques animaux (n=5).

**Figure 12. Elévation et rotation de la queue chez l'animal anesthésié suite à l'injection intrahippocampique de 11 nmol de soman**

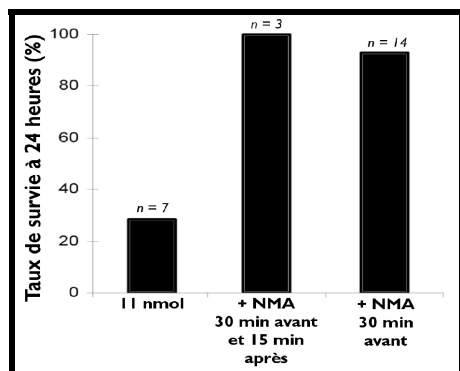


Images successives illustrant un cycle complet (environ 10 s) de l'élévation et du tournoiement de la queue chez la souris de souche C57BL/6 suite à l'injection intrahippocampique de 11 nmol de soman. Cette atteinte pathologique très caractéristique apparaît 2 à 3 min post-injection et consiste en une élévation lente suivie d'une rotation de la base de la queue.

Comme indiqué précédemment, au sortir de l'anesthésie, ces fortes perturbations ont persisté et ont abouti à la mort de cinq animaux sur les sept injectés avec le soman au cours des 24 h qui ont suivi l'injection. L'administration de NMA n'a pas modifié la séquence caractéristique d'événements pathophysiologiques faisant suite à l'injection de 11 nmol de soman (notamment le tournoiement de la queue), mais a permis d'augmenter clairement la survie des animaux (Figure 13) : en effet, son administration 30 min avant l'injection



intra-hippocampique de soman (en association ou non avec une seconde injection de NMA 15 min après la première) a provoqué une mortalité beaucoup plus faible (un décès sur 17 souris intoxiquées ; Figure 13).



**Figure 13. Optimisation de la protection périphérique par le nitrate de méthyl-atropine suite à l'injection intra-hippocampique de 11 nmol de soman**

La micro-injection intra-hippocampique de 11 nmol de soman induit une surmortalité sévère chez les animaux (5/7). Le taux de survie à 24 h est significativement amélioré par l'injection de NMA (200 µl, 4 mg/kg, ip) 30 min avant l'injection intra-hippocampique de 11 nmol de soman.

### *III.1.2. Etude électro-encéphalographique*

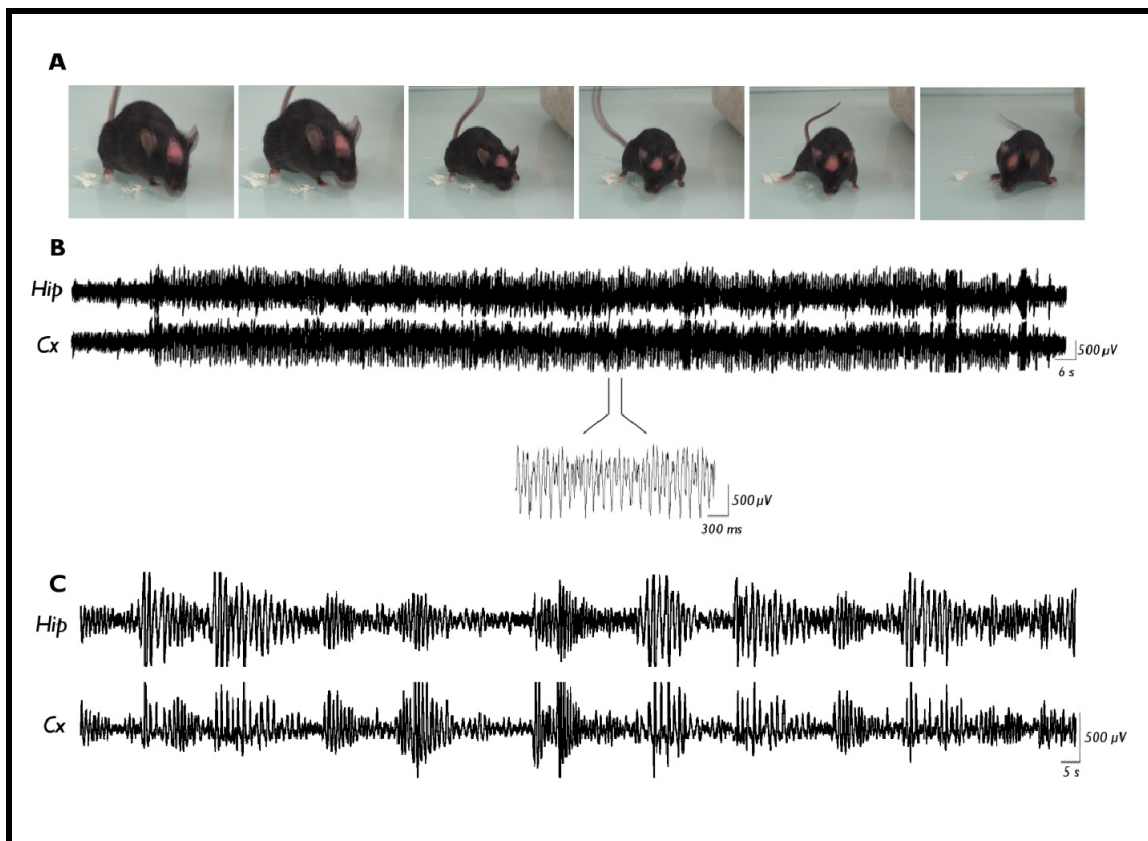
Aucun événement paroxystique pathologique n'a été enregistré chez les animaux TEM durant les 4 semaines de suivi EEG (n=2).

Au sortir de l'anesthésie (2 à 3 h post-injection), les animaux du groupe soman ont présenté des secousses rythmiques de l'ensemble du corps pendant une durée de 1 à 3 h (n=24). Après cette phase aiguë, le comportement des animaux a été généralement caractérisé par de longues phases d'immobilité. L'étude EEG révèle une séquence continue de polypointes (SE) enregistrée sur les dérives hippocampique et corticale pendant plusieurs heures après l'injection. Durant les 48 h d'analyse EEG, cette activité ictale a diminué d'intensité et a laissé place progressivement à des décharges périodiques puis à des pointes isolées (n=3, Figure 14).

L'étude EEG chronique a révélé des décharges paroxystiques périodiques en fin de première semaine d'analyse post-intoxication et ceci jusqu'à la quatrième semaine d'étude (n=9, Figure 14). Ces événements paroxystiques ont toujours été détectés à la fois sur les

dérivations hippocampique et corticales (Figure 14) et ont souvent été associés à des mouvements de tête stéréotypés de grande amplitude.

**Figure 14. Crises motrices, *status epilepticus* et décharges paroxystiques à long terme après l'injection intrahippocampique de 11 nmol de soman chez la souris**



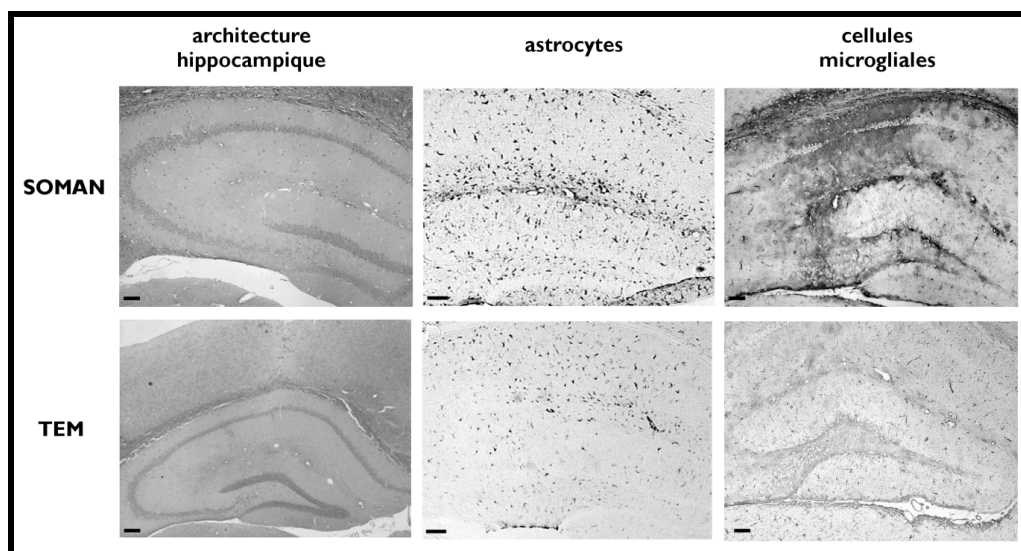
(A), au sortir de l'anesthésie (2-3 h après l'injection), les souris présentent des secousses rythmiques de grande ampleur, entrecoupées de troubles posturaux pendant une durée de 1 à 3 h (n=24). (B), ces troubles moteurs sont associés à une activité électrique paroxystique présente sur les dérives hippocampique (Hip) et corticale (Cx) (n=3). L'activité ictale est caractérisée par des séquences de polypointes dans la gamme de fréquence 4-8 Hz. (C), enregistrement EEG hippocampique et cortical représentant des décharges paroxystiques, sous forme de bouffées, détectées 2 semaines après l'injection.

### III.1.3. Analyse histologique

Le marquage H&P n'a révélé aucun événement neurodégénératif dans l'hippocampe ipsilatéral ni dans les autres structures quel que soit le temps d'étude (48 h, n=4 ; 3 j, n=3 ; 30 j, n=11 ; Figure 15). Suite à la micro-injection de soman, les cellules GFAP-positives semblent plus nombreuses et plus hypertrophiées que dans le groupe TEM, notamment à 30 j de l'injection (n=11, Figure 15). Le marquage des cellules microgliales par la lectine GSA-IB4 a indiqué des cellules faiblement marquées et pourvues de prolongements fins aux temps 48 h et 3 j au sein de l'hippocampe ipsilatéral (données non illustrées). À 30 j de la micro-injection, le marquage était diffus, majoritairement restreint à la zone d'injection, et ne permettait pas de distinguer une quelconque morphologie cellulaire (n=11, Figure 15).

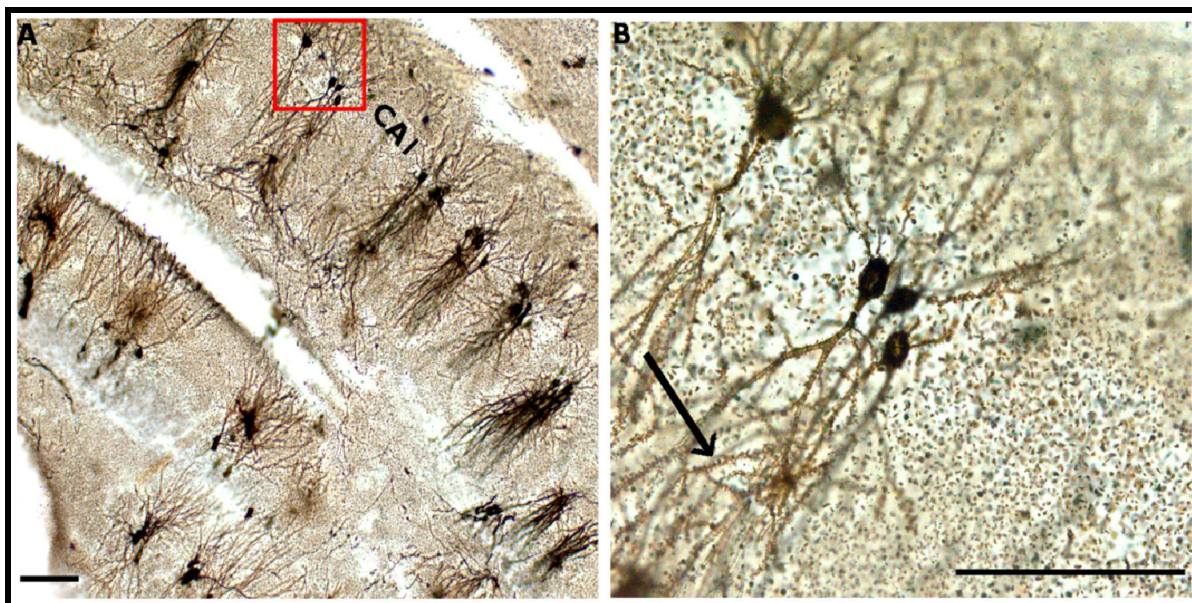
La méthode de Golgi appliquée sur un nombre restreint d'animaux (n=2) n'a révélé aucune anomalie morphologique des neurones au sein de l'hippocampe ipsilatéral 6 mois après l'injection de soman (Figure 16).

**Figure 15. Analyse histopathologique 30 jours après l'injection intrahippocampique de 11 nmol de soman chez la souris**



Photographie représentative d'une coupe frontale d'hippocampe ipsilatéral 30 j après l'injection intrahippocampique de 11 nmol de soman. Aucun événement neurodégénératif, ni aucune anomalie de l'architecture hippocampique n'a été détectée à ce temps d'étude avec la coloration H&P (n=11). La détection immunohistochimique de la protéine GFAP a mis en évidence une réactivité astrogliale modérée. Le marquage histochimique à la lectine GSA-IB4 a révélé un marquage diffus des cellules microgliales, localisé au site d'injection. Barre d'échelle, 100  $\mu\text{m}$ .

**Figure 16. Etude morphologique des neurones de l'hippocampe ipsilatéral 6 mois après la micro-injection intrahippocampique de 11 nmol de soman par imprégnation argentique (méthode de Golgi)**



(A), l'hippocampe ipsilatéral des deux animaux n'a pas montré de modifications morphologiques des neurones. (B), la visualisation d'épines dendritiques (flèche) est rendue possible avec cette technique. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

Les événements physiologiques initiaux ainsi que la protection par le NMA sont en faveur d'un fort passage périphérique du toxique, incompatible avec notre projet initial consistant en l'étude d'une modification cholinergique focale. Ainsi, afin d'étudier localement les changements neurobiologiques induits par le soman, une étude de relation dose-effet a été initiée. Cette étude a pour but de déterminer une dose épiléptogène induisant les effets les plus locaux possibles.

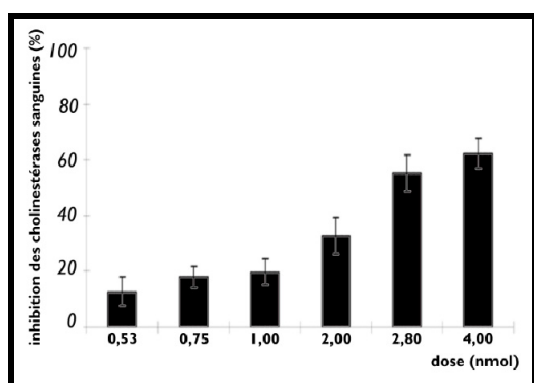
### **III.2. Étude dose-effet (4 ; 2,8 ; 2 ; 1 ; 0,75 et 0,53 nmol)**

#### ***III.2.1. Conséquences pathologiques et dosage des cholinestérases sanguines***

Quand la dose de soman a été réduite ( $\leq 4$  nmol), tous les animaux ont survécu sans recours à une protection périphérique fournie par le NMA. Aucun des signes toxiques décrits après l'injection de 11 nmol n'a été constaté. Cependant une augmentation du délai au réveil post-anesthésique, une réduction de la locomotion spontanée et une stupeur exagérée ont été

notées durant les heures qui suivent l'injection. Une heure après l'injection des différentes doses de soman dans l'hippocampe, l'inhibition des ChE sanguines augmente clairement avec la dose (

Figure 17).



**Figure 17. Inhibition des cholinestérases sanguines une heure après l'injection intrahippocampique d'une gamme de doses de soman**

Pour chacun des animaux, l'inhibition des cholinestérases sanguines a été exprimée en pourcentage de l'activité 30 min avant l'injection. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  ES de 4, 4, 8, 3, 4 et 4 valeurs pour les doses de 0,53 ; 0,75 ; 1 ; 2 ; 2,8 et 4 nmol respectivement.

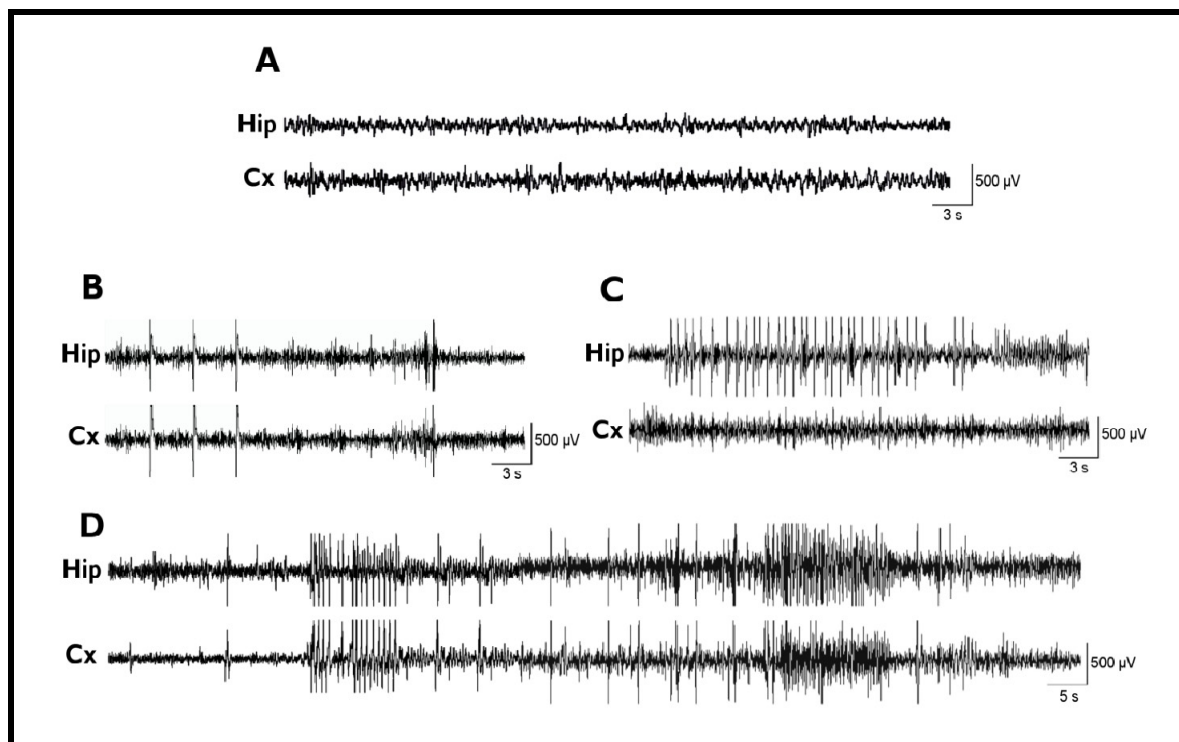
### *III.2.2. Étude électro-encéphalographique*

L'étude EEG n'a pas révélé d'événements paroxystiques de type épileptique durant les premières 24 h post-intoxication quelle que soit la dose (4 ; 2,8 ; 2 et 1 nmol ; n=1 par dose). Cependant, après une période dont la durée dépend de la dose (voir Tableau 2), des pointes et polypointes, principalement au niveau de la dérivation hippocampique (Figure 18B), suivies par des décharges paroxystiques récurrentes à type de polypointes et de polypointes-onde ont été détectées (4-8 Hz, Figure 18C, D).

Les animaux TEM n'ont pas présenté d'événements épileptiques durant les 12 semaines d'analyse (n=4). De même, l'injection intrahippocampique d'une dose de 0,53 nmol de soman n'a pas induit d'événements EEG paroxystiques pathologiques durant les 12 semaines de l'étude (n=4). Une seule souris sur les quatre injectées avec 0,75 nmol a présenté des décharges paroxystiques, et ceci à partir de la quatrième semaine d'investigation (28 j post-injection, Tableau 2). En augmentant les doses de soman (4 ; 2,8 ; 2 et 1 nmol), le temps de latence avant la détection de la première décharge paroxystique EEG tend à diminuer et le

pourcentage d'animaux présentant ces événements EEG tend à augmenter (Tableau 2). Les caractéristiques de ces crises EEG sont communes aux différents groupes d'étude du soman : ces crises étaient plus fréquentes durant les heures sombres (>19 heures) et n'avaient pas d'expression clinique majeure, sinon une immobilité exagérée. La durée moyenne des événements paroxystiques enregistrés est d'environ 15 s et semble ne pas évoluer avec le temps alors que la fréquence des crises tend à augmenter jusqu'à atteindre, après 12 semaines, environ dix décharges par jour (Tableau 2).

**Figure 18. Caractéristiques des décharges paroxystiques récurrentes à divers temps après l'injection intrahippocampique de soman**



Tracés EEG hippocampique (Hip) et cortical (Cx) représentatifs des animaux témoins (TEM) et injectés avec le soman à des temps variables après l'injection. (A), EEG typique chez les souris TEM, ne démontrant pas d'activité paroxystique détectable durant les 12 semaines de suivi après l'injection de sérum physiologique (n=4). (B), une semaine après l'injection, tous les animaux traités avec le soman à une dose supérieure ou égale à 1 nmol ont présenté des pointes isolées ou des polypointes sur les deux dérivation ; (C), exemple de décharge paroxystique hippocampique 8 semaines après l'injection de 1 nmol de soman ; (E) autre exemple de décharge paroxystique présente sur les dérivation hippocampique et corticale.

### ***III.2.3. Conséquences histologiques***

Aucun dommage cellulaire n'a été détecté avec le marquage H&P 12 semaines après l'injection, ni dans le groupe TEM (n=4, Figure 19), ni dans le groupe soman, quelle que soit la dose injectée (n=21, Figure 19). Ceci a été confirmé dans la structure hippocampique en observant la densité des neurones NeuN-positifs chez les souris TEM et soman (Figure 19). Cependant, l'immunomarquage GFAP semblait légèrement augmenté 12 semaines post-injection au sein de l'hippocampe ipsilatéral des souris chez lesquelles des crises EEG ont été détectées (soman, n=11 ; Figure 19). Cette immunoréactivité différait sensiblement des souris TEM (Figure 19) principalement aux alentours du site d'injection et s'étendait également rostro-caudalement depuis ce site (données non illustrées).

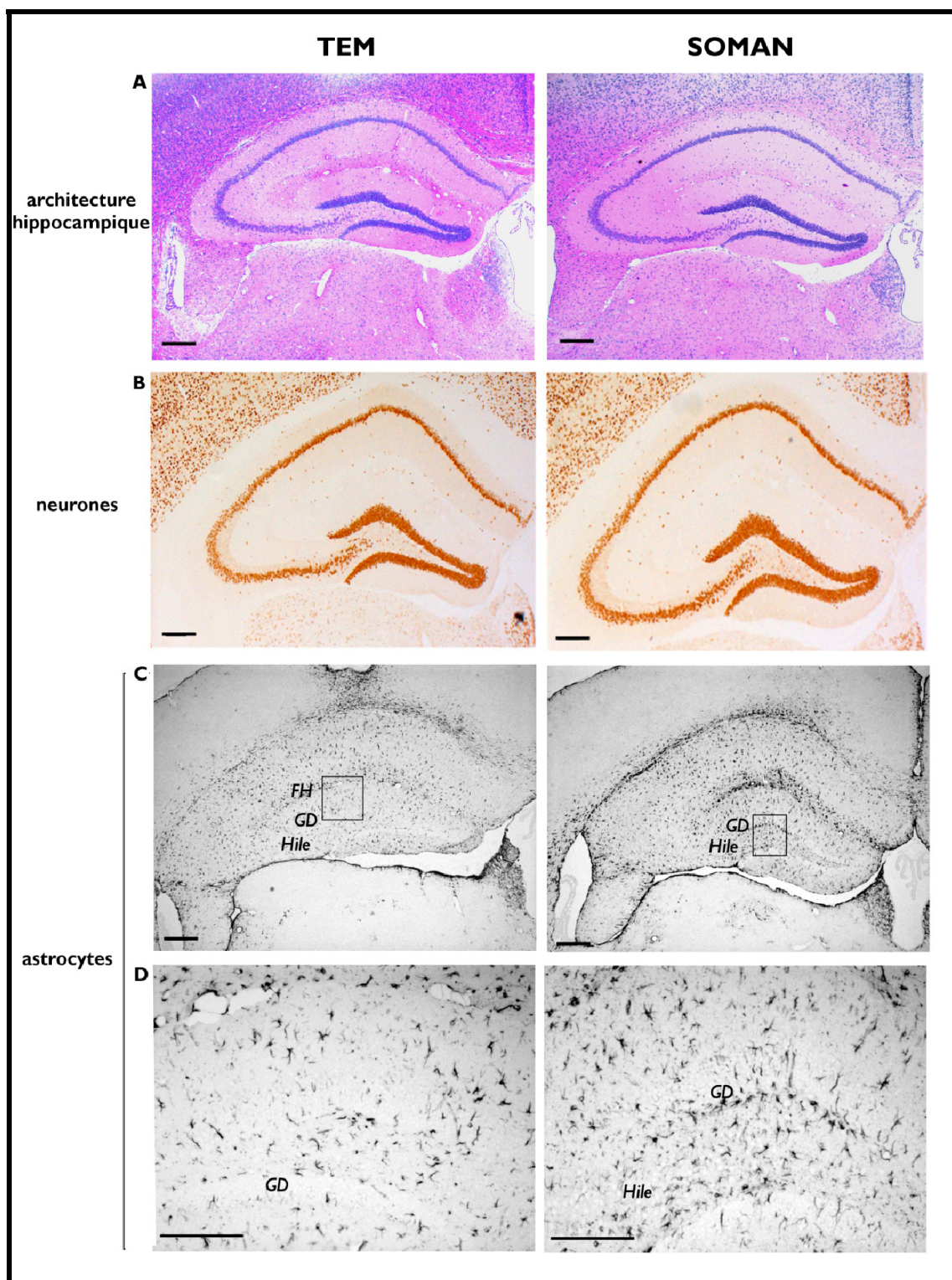
**Tableau 2. Caractéristiques des décharges paroxystiques après l'injection intrahippocampique d'une gamme de doses de soman**

Dose	Animaux injectés	Étude électro-encéphalographique					Détection des premières crises EEG (jours) ; [amplitude] ; moyenne $\pm$ ES ; 25-75 <sup>ème</sup> percentile
		Semaine 1	Semaine 2	Semaine 4	Semaine 8	Semaine 12	
<b>4 nmol</b> ; n	4	4	4	3	3	3	[4-12] ; 8.75 $\pm$ 1.25 ; 7.5-9.75
Animaux présentant des décharges (%)		100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	
Fréquences des décharges (décharges/jour)		4.3 $\pm$ 1.0	9.9 $\pm$ 3.2	11.0 $\pm$ 2.2	9.1 $\pm$ 1.0	9.8 $\pm$ 0.8	
Durée des décharges (s)		10 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	
<b>2,8 nmol</b> ; n	4	-	3	2	2	2	[8-13] ; 10.5 $\pm$ 2.5 ; 10-12.5
Animaux présentant des décharges (%)		-	100 %	100 %	100 %	100 %	
Fréquences des décharges (décharges/jour)		-	11.0 $\pm$ 2.0	8.5 $\pm$ 0.5	7.8 $\pm$ 0.2	9.8 $\pm$ 0.2	
Durée des décharges (s)		-	12 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1	
<b>2 nmol</b> ; n	3	2	2	1	1	1	[5-28] ; 16.5 $\pm$ 11.5 ; 10.7-22.2
Animaux présentant des décharges (%)		50 %	50 %	100 %	100 %	100 %	
Fréquences des décharges (décharges/jour)		6.1	6.2	8.2	9.9	7.6	
Durée des décharges (s)		10 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2	12 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	
<b>1 nmol</b> ; n	8	7	7	5	5	4	[5-55] ; 17.1 $\pm$ 11.2 ; 6-19.5
Animaux présentant des décharges (%)		43 %	57 %	80 %	100 %	100 %	
Fréquences des décharges (décharges/jour)		5.9 $\pm$ 0.9	1.8 $\pm$ 0.2	10.4 $\pm$ 2.5	8.1 $\pm$ 1.1	11.2 $\pm$ 2.5	
Durée des décharges (s)		14 $\pm$ 1	13 $\pm$ 3	12 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	
<b>0,75 nmol</b> ; n	4	4	4	4	4	4	28
Animaux présentant des décharges (%)		0 %	0 %	25 %	25 %	25 %	
Fréquences des décharges (décharges/jour)		0	0	0.6	3.7	3.0	
Durée des décharges (s)		0	0	9 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1	12 $\pm$ 4	
<b>0,53 nmol</b> ; n	4	4	4	4	4	4	-
Animaux présentant des décharges (%)		0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
Fréquences des décharges (décharges/jour)		0	0	0	0	0	
Durée des décharges (s)		0	0	0	0	0	

Les données sont présentées par la moyenne  $\pm$  ES. Aucune des souris TEM n'a présenté de décharges paroxystiques (n=4). La fréquence des décharges correspond au nombre de décharges EEG/durée totale de la session d'enregistrement. Abréviations : n, nombre de souris ; -, aucune donnée collectée. Certaines souris ont été sacrifiées 21 j post-injection pour un contrôle histologique après détection de crises EEG (doses > 0,75 nmol, n=1 par dose). Certains animaux ont été exclus de cette étude en raison d'un EEG de qualité médiocre (2,8 nmol, n=1 ; 2 nmol, n=1 ; 1 nmol, n=1). Un animal a perdu son implant EEG avant l'enregistrement de la dernière session (1 nmol, n=1) et un autre est décédé à distance de l'injection (1 nmol, n=1).



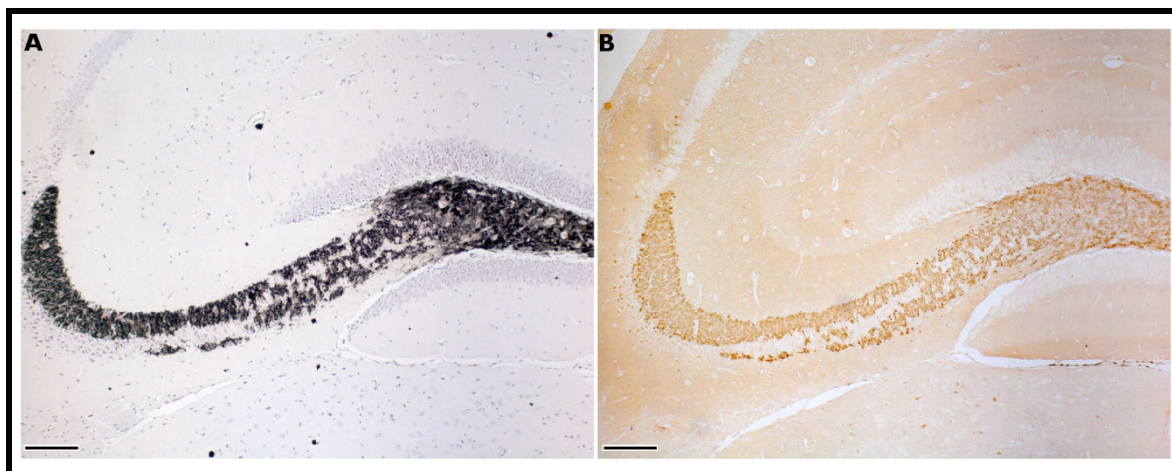
Figure 19. Étude histologique de l'hippocampe ipsilatéral 12 semaines après l'injection intrahippocampique de 1 nmol de soman



Colonne de gauche : groupe témoin (TEM, souris injectées avec du sérum physiologique) ; colonne de droite : animaux injectés avec 1 nmol de soman, 12 semaines post-injection. (A), la coloration H&P et (B) l'immunohistochimie NeuN n'ont pas permis de révéler de différences notables entre les deux groupes d'animaux. (C), l'immunohistochimie GFAP a montré une réactivité limitée des astrocytes chez le groupe TEM mais augmentée chez les animaux du groupe soman, principalement le long de la fissure hippocampique. (D), l'agrandissement du cadre de (C) permet d'indiquer une réactivité astrogliale supérieure chez le groupe soman. Abréviations : FH, fissure hippocampique ; GD, gyrus denté. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

Trois mois après l'injection, aucun phénomène de bourgeonnement des fibres moussues, ni dans la couche CA3 ni dans la zone supragranulaire du GD de l'hippocampe ipsilatéral n'a été constaté après coloration de Timm ou détection immunohistochimique de ZnT<sub>3</sub> chez les animaux ayant présenté des décharges paroxystiques récurrentes (n=10).

**Figure 20. Étude du bourgeonnement des fibres moussues suite à la micro-injection intrahippocampique de soman**



L'étude préliminaire de la visualisation des fibres moussues par le marquage Timm (A) ou par détection immunohistochimique d'un transporteur au zinc, ZnT<sub>3</sub>, (B) n'a pas permis de visualiser un bourgeonnement chez les animaux présentant des décharges récurrentes 3 mois post-injection (n=10). Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. L'anticorps anti-ZnT<sub>3</sub> est un don généreux du Dr R.D. Palmiter par l'intermédiaire du Dr A. Depaulis.

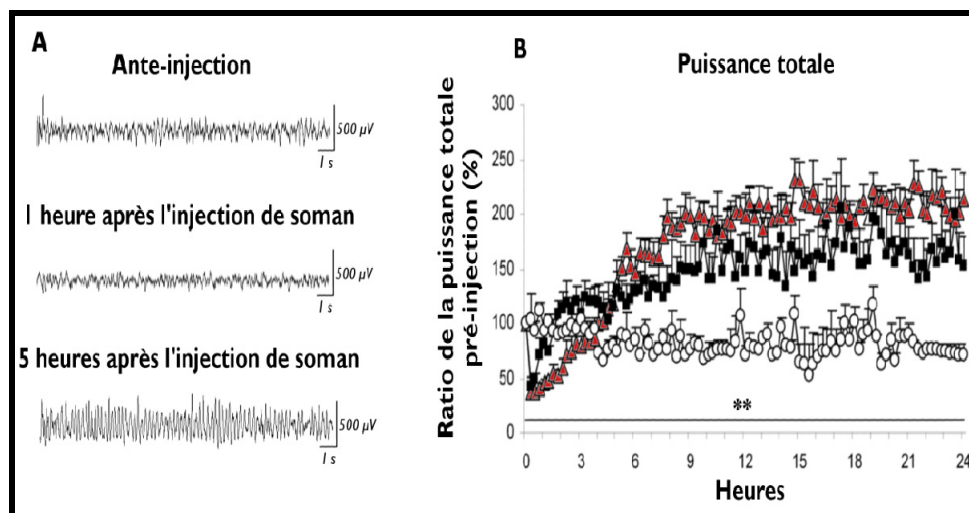
### III.3. Étude des variations initiales (4 et 1 nmol)

#### III.3.1. Étude des variations EEG

L'enregistrement EEG avant injection révèle une activité désynchronisée typique de l'état de vigilance (Figure 21A). Rapidement après l'injection de soman, effectuée sous anesthésie légère et courte, les animaux sont restés calmes et sans réponse aux stimuli externes, avec quelquefois un déplacement sur le ventre. Cette profonde réduction de l'activité locomotrice spontanée a duré environ 3 h et a été associée à une réduction de l'énergie totale hippocampique (n=10, Figure 21B). Ceci n'a pas été observé chez les animaux TEM-P qui ont repris une activité motrice spontanée 20 à 35 min après l'anesthésie (n=6). Chez les animaux injectés avec le soman, des épisodes répétés d'exploration de l'environnement, de

toilettage stéréotypé et d'immobilité ont été notés après la phase initiale de locomotion réduite (n=10). Cette période a été associée sur le plan EEG à une augmentation progressive de l'énergie totale hippocampique ipsilatérale (Figure 21B) et à des pointes occasionnelles sur les dérivations hippocampiques et corticales (données non illustrées).

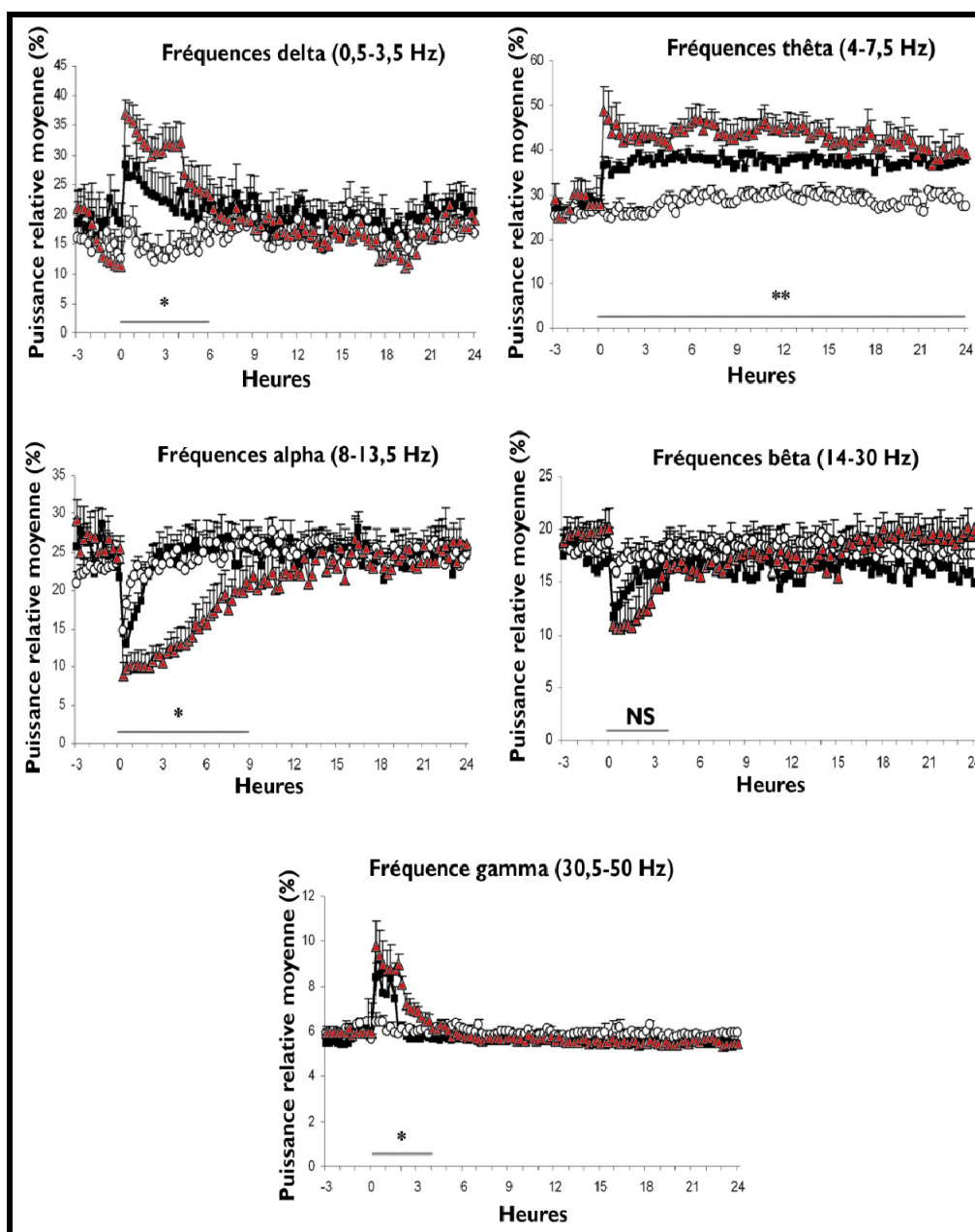
**Figure 21. Activité continue d'ondes thêta (4-8 Hz) et effet diphasique sur l'excitabilité hippocampique de l'injection intrahippocampique de soman (1 et 4 nmol)**



(A), avant l'injection, les animaux des différents groupes (soman 4 nmol, soman 1 nmol et TEM-P) ont présenté une activité EEG hippocampique désynchronisée typique de l'état d'éveil calme (n=16). L'injection de soman (1 ou 4 nmol, n=10) a induit un effet dépressur sur l'activité EEG hippocampique ipsilatérale qui a précédé une activité continue d'ondes thêta (4-8 Hz) de grande amplitude. (B), la courbe représente l'évolution de l'énergie totale hippocampique ipsilatérale durant les premières 24 h suite à l'injection de soman. L'effet dépressur initial a précédé une augmentation de la puissance totale hippocampique. Seule la dose de 4 mol a induit des variations statistiquement significatives du spectre EEG (\*\*,  $p < 0,001$ ). Voir la légende de la figure suivante et la section C, page 197 pour la méthodologie statistique.

Même si les deux doses de soman étudiées ont induit des altérations communes et très caractéristiques du spectre EEG au sein de l'hippocampe ipsilatéral (voir plus loin), seule la dose de 4 nmol a produit des variations statistiquement différentes des données obtenues chez les animaux TEM-P. Dans le groupe soman, l'activité physiologique pré-injection (Figure 21A) est en effet remplacée par une activité régulière d'ondes  $\theta$  (Figure 21A). L'énergie relative des bandes de fréquences  $\alpha$  et  $\beta$  ont eu une tendance à diminuer, alors qu'une tendance inverse a été constatée pour les bandes de fréquences  $\delta$ ,  $\theta$  et  $\gamma$  (Figure 22). Ces changements ont été relativement transitoires, ne durant pas plus de quelques heures, sauf pour la bande  $\theta$  qui différait encore du groupe TEM-P 24 h après l'injection (Figure 22).

Figure 22. Altération initiale de la rythmogenèse hippocampique ipsilatérale

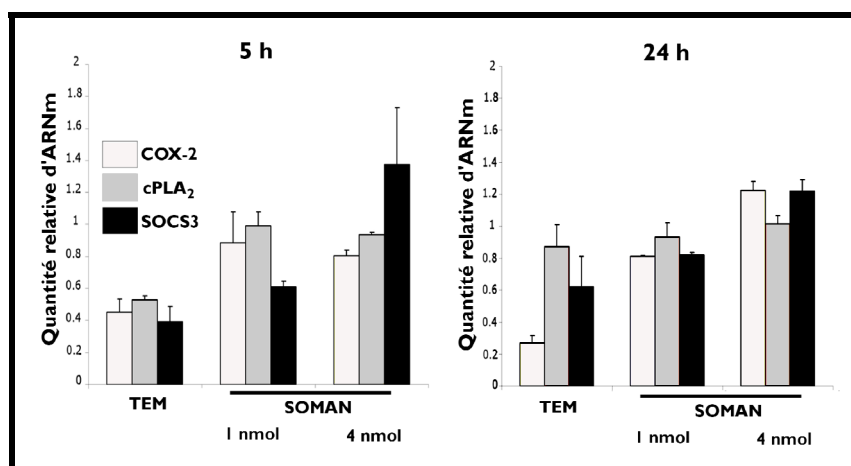


Les courbes représentent les variations de l'énergie relative de l'EEG dans les bandes de fréquences delta, thêta, alpha, bêta et gamma durant les premières 24 h chez les souris du groupe TEM-P (rond blanc, n=6) ou du groupe soman (1 nmol, carré noir et 4 nmol, triangle rouge ; n=6 et 4, respectivement). Des enregistrements EEG continus de 15 min de chaque animal ont été moyennés afin de déterminer le spectre de chaque groupe. Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  ES. Pour chaque courbe individuelle, l'aire sous la courbe (ASC) a été calculée afin de comparer statistiquement les trois groupes. La fenêtre temporelle pour le calcul de l'ASC est représentée par une droite grisée sous les données (voir explications dans Section C, page 197). Seule la dose de 4 mol a induit des variations statistiquement significatives du spectre EEG (NS, non significatif ; \*,  $p < 0,05$  ; \*\*,  $p < 0,001$ ).

### III.3.2. Étude de certains médiateurs moléculaires de la neuro-inflammation

L'ARNm de l'IL-1 $\beta$  n'a pas pu être détecté ni dans le groupe TEM, ni dans le groupe soman avec les deux doses utilisées (4 et 1 nmol) aux deux temps étudiés (5 et 24 h post-injection, données non illustrées) probablement en raison d'une concentration trop faible. Les expérimentations RT-qPCR ont montré de très faibles variations des taux relatifs d'ARNm des trois autres gènes étudiés (SOCS3, cPLA<sub>2</sub> et COX-2 ; Figure 23). Pour certains des gènes (SOCS3 et COX-2), la relation dose-effet suggérée n'atteint pas le seuil de signification statistique.

**Figure 23. Analyse RT-qPCR de l'expression génique de marqueurs inflammatoires sélectionnés dans l'hippocampe ipsilatéral 5 et 24 heures après l'injection intrahippocampique de soman (1 et 4 nmol)**



Le groupe TEM est constitué d'animaux ayant reçu une injection intrahippocampique de sérum physiologique (n=5 par temps). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  ES des niveaux d'ARNm normalisés (n=5 par groupe et par temps). Barre blanche, cyclo-oxygénase-2 (COX-2) ; barre grise, phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique ; barre noire, protéine suppressive du signal cytokinique 3 (SOCS3). Les quantités d'ARNm de l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) sont restées en dessous du seuil de détection pour l'ensemble des animaux de cette étude.

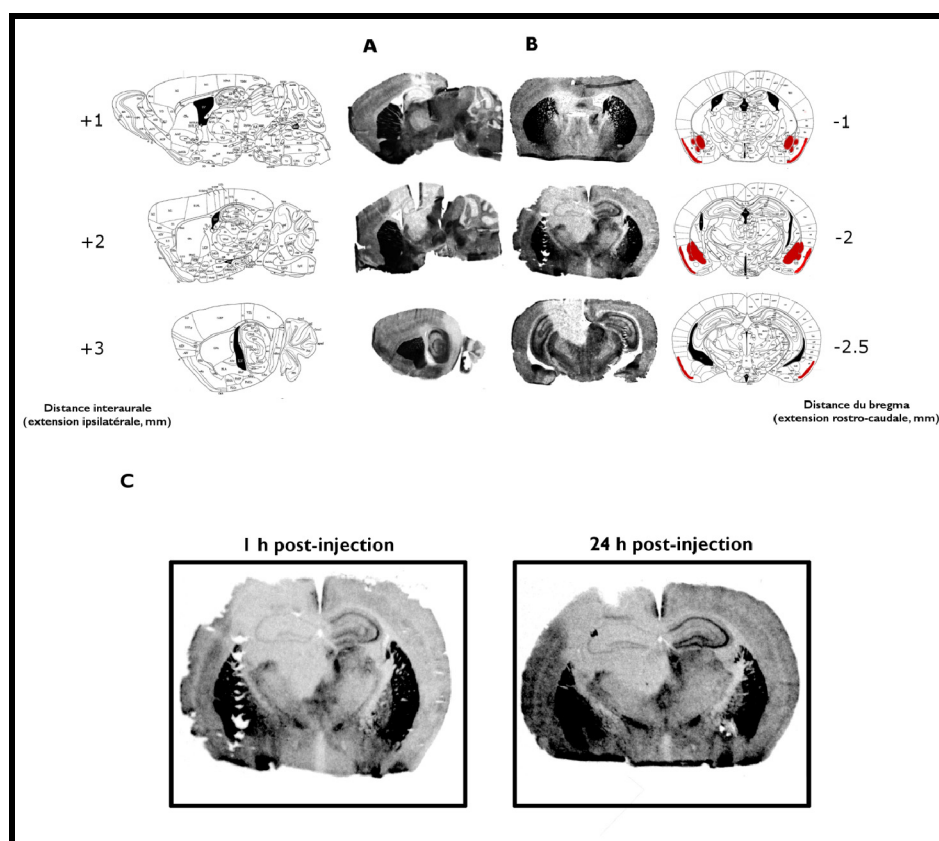
## III.4. Caractérisation de la dose 1 nmol

### III.4.1. Caractérisation de la diffusion cérébrale du toxique

Une heure après la micro-injection, le soman induit une nette et très large inhibition des ChE centrales, visible par un blanchiment des coupes au niveau de l'hippocampe ipsilatéral (n=4, Figure 24). Cette inhibition a été également détectée ipsilatéralement au niveau de la

partie dorsale du thalamus et dans des territoires du néocortex incluant les cortex cingulaire, moteur et visuel (n=4, Figure 24). En revanche, l'hémisphère controlatéral est comparable aux coupes des animaux témoins (données non illustrées). Aux temps plus tardifs (3, 5, 12 et 24 h), ni l'intensité de l'inhibition, ni les territoires impliqués n'ont varié (n=12, Figure 24E). De façon importante, aucun blanchiment massif n'a été détecté dans des zones distantes du site d'injection comme les noyaux amygdaliens ou le cortex piriforme.

**Figure 24. Étendue de la diffusion du toxique dans le cerveau de la souris 1 à 24 heures après l'injection intrahippocampique de soman (1 nmol)**



Photomicrographies de coupes sagittales (A) et frontales (B) de souris, révélant l'activité cholinérasique 1 h après l'injection intrahippocampique unilatérale de soman (1 nmol). Les nombres indiquent les coordonnées par rapport à la scissure interhémisphérique (coupes sagittales) ou au bregma (coupes frontales). Noter l'inhibition (blanchiment du tissu) qui diffuse dans l'hippocampe ipsilatéral, la partie dorsale du néocortex et du thalamus. Aucune inhibition n'a été détectée au niveau de l'amygdale et du cortex piriforme (en rouge sur les schémas, d'après Paxinos et Franklin (2001)). (C), ni l'intensité de l'inhibition, ni les zones impliquées n'ont semblé varier aux différents temps d'étude (jusqu'à 24 h post-injection).

### III.4.2. Caractérisation de l'activation neuronale par la protéine Fos

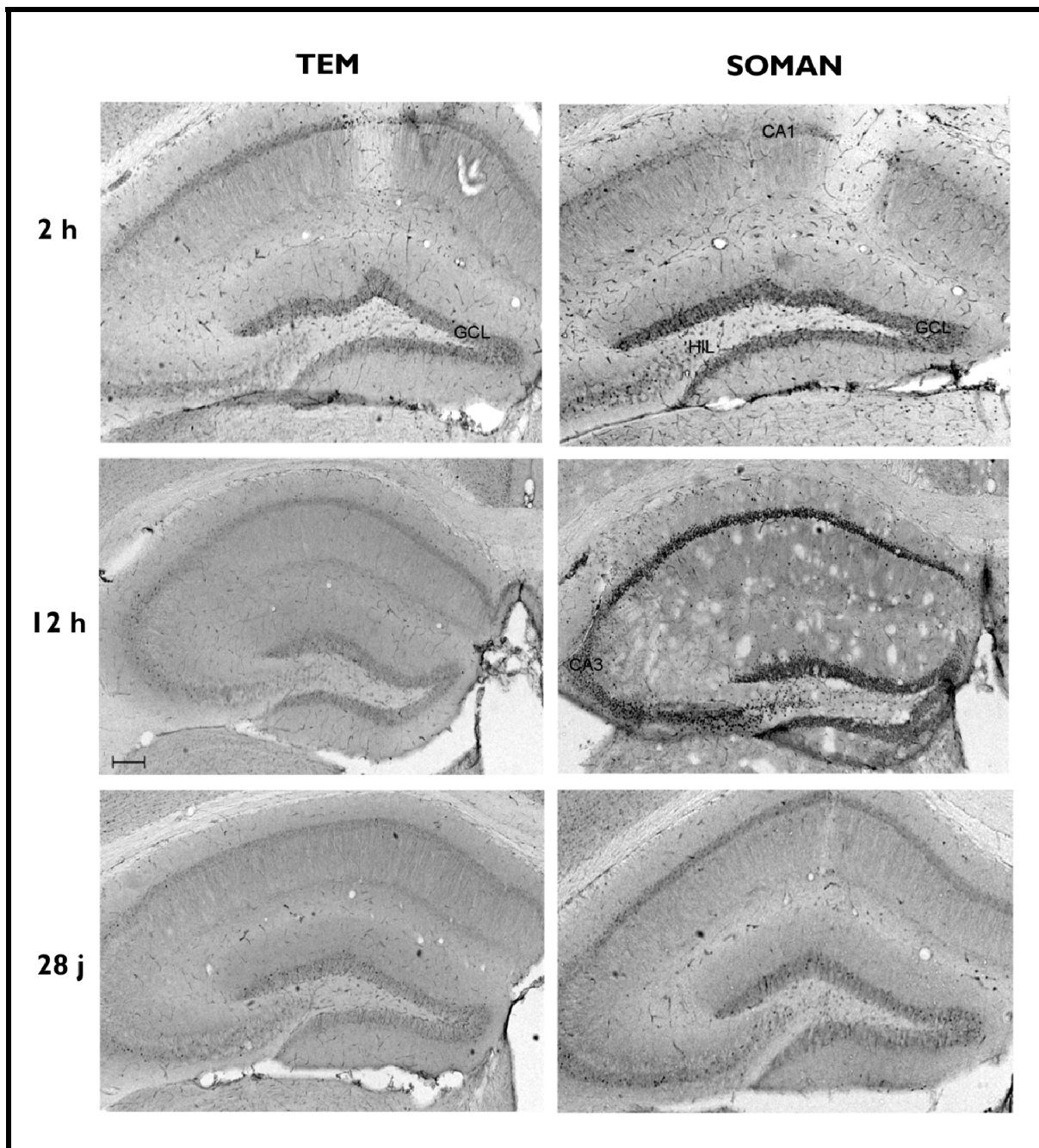
*Hippocampe ipsilatéral* : Les animaux du groupe TEM ont montré un marquage diffus de la protéine Fos, faible et transitoire, qui a disparu un jour après l'injection de sérum physiologique (n=18, Figure 25). Chez les animaux du groupe soman, des cellules Fos-positives ont été observées dès 2 h après l'injection au niveau de la couche granulaire du GD. À ce même temps, très peu de cellules marquées ont été détectées au sein des secteurs CA1 et CA3 (n=2, Figure 25). Douze heures après l'injection, le nombre de cellules Fos-positives a très fortement augmenté dans ces mêmes régions (n=2, Figure 25). Un et deux jours après l'administration du soman, les cellules Fos-positives étaient encore nombreuses (Tableau 3). Les jours suivants, le nombre de cellules Fos-positives a diminué ou a disparu (Tableau 3). Des cellules isolées ont cependant été observées 28 j post-injection, dans le bras supérieur du GD, le hile et CA3 (n=2, Figure 25). *Autres régions du cerveau* : comme résumé dans le Tableau 3, l'expression de la protéine Fos a été détectée dans l'hippocampe controlatéral ainsi que dans d'autres régions comme le néocortex, le cortex piriforme et le complexe amygdalien (Tableau 3). Les cellules Fos-positives étaient cependant moins nombreuses dans l'hémisphère controlatéral.

**Tableau 3. Schéma spatio-temporel de l'expression de la protéine Fos après l'injection intrahippocampique unilatérale de soman (1 nmol)**

	Gyrus denté		CA1		CA3		Cortex piriforme		Amygdale		Cortex cingulaire		Néocortex	
	ipsi	cont	ipsi	cont	ipsi	cont	ipsi	cont	ipsi	cont	ipsi	cont	ipsi	cont
<b>2h</b>	■													
<b>5h</b>	■						■		■		■			
<b>12h</b>			■		■								■	
<b>24h</b>											■			
<b>48h</b>											■			
<b>3 j</b>														
<b>7 j</b>														
<b>14 j</b>														
<b>28 j</b>														

Zone blanche, ratio de cellules Fos-positives entre 1 et 2 par rapport au groupe TEM ; zone grisée, ratio  $\leq 5$  ; zone noire, ratio  $> 5$ . Abréviations : ipsi, côté ipsilatéral à l'injection ; cont, côté controlatéral.

**Figure 25. Étude spatio-temporelle de l'activation neuronale à divers temps après l'injection intrahippocampique de 1 nmol de soman**



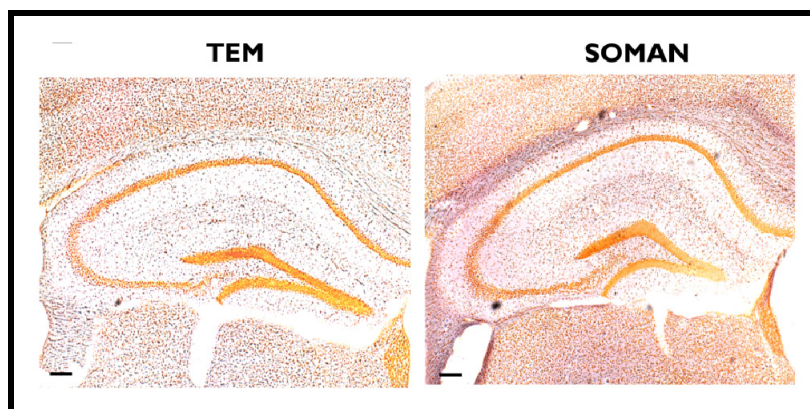
L'expression de la protéine Fos a été étudiée par immunohistochimie sur des coupes flottantes de la région hippocampique de cerveaux de souris injectées avec du sérum physiologique (TEM, colonne de gauche), ou avec 1 nmol de soman (colonne de droite). Dans le groupe TEM, quelques cellules Fos-positives ont été détectées 2 h après l'injection au niveau des cellules granulaires du gyrus denté (GD). Douze heures ou 28 j après l'injection, ce marquage était complètement atténué. Deux heures après l'injection de soman, un marquage Fos important a été détecté au niveau des cellules granulaires du GD ainsi que dans le hile, alors qu'un faible nombre de cellules Fos-positives étaient détectées dans le secteur CA1 à ce temps d'étude. Douze heures post-injection, le GD, le hile ainsi que les couches CA1 et CA3 étaient intensément marqués. Le nombre de cellules marquées a fortement diminué 28 j après l'injection, bien que des cellules isolées expriment Fos dans le GD, le hile et la couche CA3.



### ***III.4.3. Détection d'événements neurodégénératifs***

Le marquage argentique n'a pas montré de phénomènes de neurodégénérescence, excepté aux alentours du trajet d'injection, 5 h après l'injection (Figure 26, ci-dessous). Ce résultat a été confirmé aux autres temps d'étude (2, 12 h, 1, 2, 3, 7, 14 et 28 j après l'injection de soman).

**Figure 26. Étude des événements neurodégénératifs cinq heures après l'injection intrahippocampique de 1 nmol de soman**



Le marquage argentique sur coupes flottantes n'a pas permis de visualiser d'événements neurodégénératifs chez les animaux témoins (TEM) ou chez les animaux du groupe soman en dehors du trajet d'injection. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

### ***III.4.4. Études comportementales lors de la phase chronique***

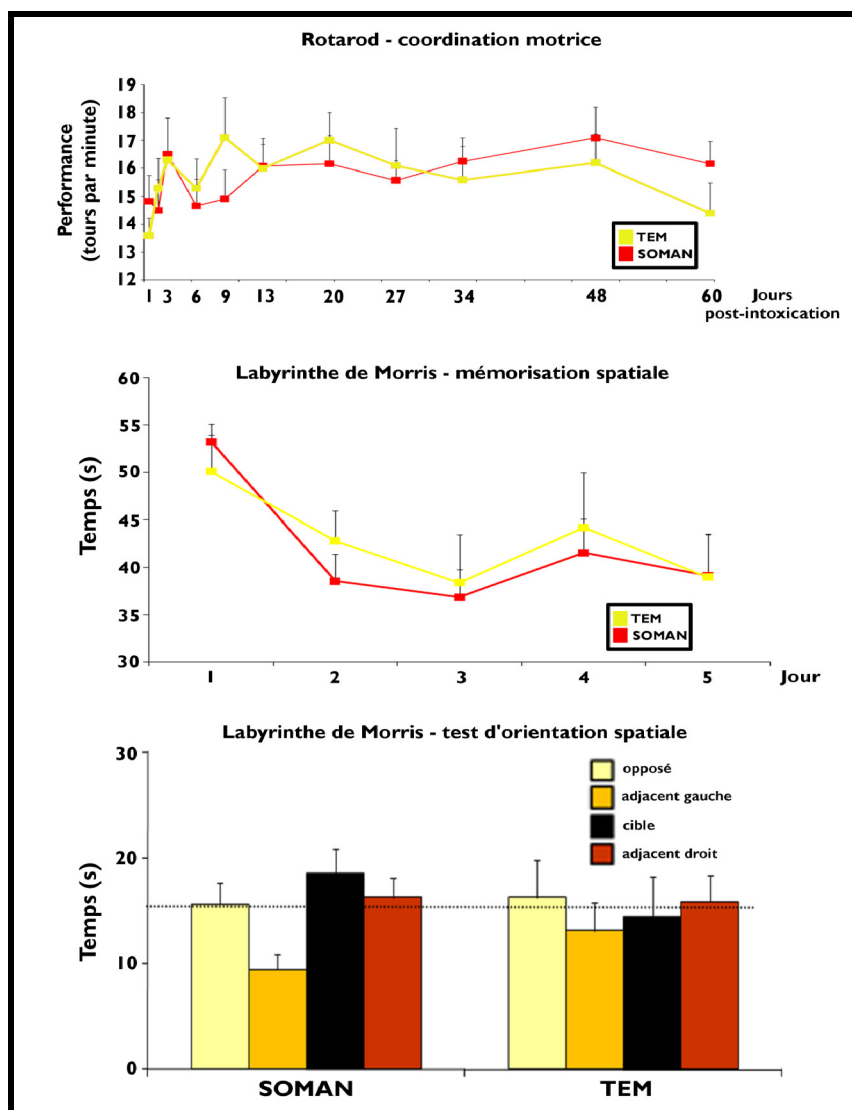
#### ***a. Coordination motrice et mémoire spatiale***

Comme illustré Figure 27, aucune différence de la performance de coordination motrice n'a été révélée au cours du test de rotarod entre le groupe TEM (n=15) et le groupe soman (n=15).

Le test du labyrinthe de Morris a révélé que les deux groupes n'avaient pas de performance d'apprentissage significativement différente, caractérisée par l'effet attendu d'une baisse du temps d'échappement avec les sessions successives (Figure 27). Il apparaît donc que les animaux injectés avec le soman apprennent la tâche aussi efficacement que les animaux TEM. Lorsque les animaux sont testés pour la mémorisation spatiale, aucune

différence n'a été détectée entre les deux groupes concernant le temps passé dans le quadrant cible (Figure 27). Il faut cependant remarquer qu'aucun des deux groupes testés (TEM et soman) ne semble avoir réellement mémorisé l'ancienne localisation de la plateforme (Figure 27). Ce résultat, plutôt étonnant, ne permet pas en tout cas de tirer de conclusion claire du test utilisé.

**Figure 27. Activité motrice et mémoire spatiale suite à l'injection intrahippocampique de 1 nmol de soman**



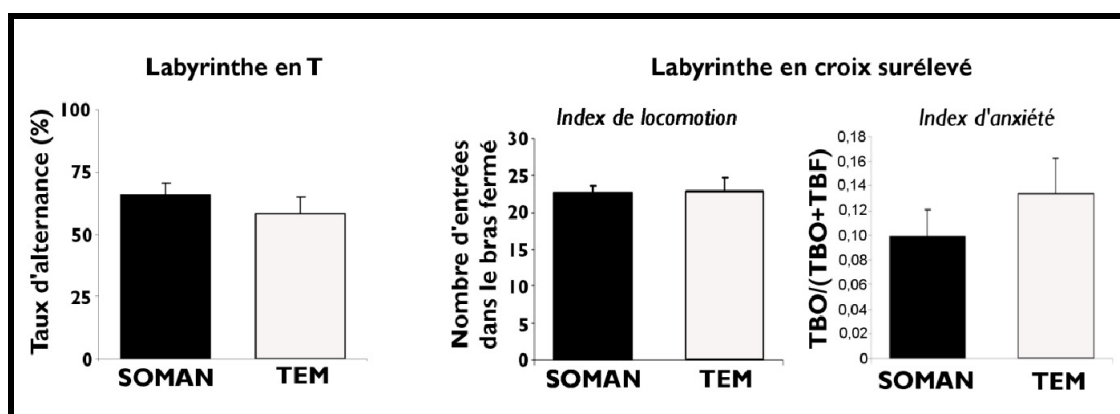
Les données sont indiquées par la moyenne  $\pm$  ES des données individuelles ( $n=15$  par groupe). Les animaux du groupe soman n'ont pas présenté de différences avec ceux du groupe TEM concernant la coordination motrice comme le montre l'étude utilisant le rotarod pendant 60 j après l'injection intrahippocampique. De même, aucun effet du soman sur la mémoire spatiale n'a été noté durant le test du labyrinthe de Morris 60 j après l'injection. Durant ce test, la diminution attendue du temps d'échappement au fur et à mesure de l'apprentissage de l'exercice était comparable chez les animaux du groupe TEM et soman. Le test de persistance de la recherche de sortie (voir Section C, page 188), indique une absence d'apprentissage du lieu de la plateforme à la fois chez les animaux du groupe TEM et chez les animaux du groupe soman.

### *b. Mémoire de travail et anxiété*

Le pourcentage d'alternance était de  $58,33 \pm 6,41\%$  (n=12) pour le groupe TEM et de  $65,91 \pm 7,74\%$  (n=11) pour le groupe soman lors du test du labyrinthe en T. L'analyse statistique n'a pas montré de différence significative entre les moyennes des deux groupes (Figure 28).

L'index d'anxiété moyen des deux groupes dans le test du labyrinthe en croix surélevé était de  $0,134 \pm 0,029$  pour le groupe TEM (n=15) et de  $0,099 \pm 0,021$  pour le groupe soman (n=15). L'analyse statistique n'a pas mis en évidence de différence significative entre les deux groupes ( $F(1,28)=1,06$  ;  $p=0,31$ ). L'index de locomotion moyen des deux groupes était de  $22,93 \pm 1,76$  pour le groupe TEM (n=15) et de  $22,60 \pm 1,06$  (n=15) pour le groupe soman. L'analyse statistique n'a pas mis en évidence de différence significative entre les deux groupes (Figure 28). L'ensemble de ces données suggère l'absence d'effet de la micro-injection intrahippocampique de soman sur le comportement d'anxiété de l'animal.

**Figure 28. Mémoire de travail et anxiété 60 jours après l'injection intrahippocampique de 1 nmol de soman**



Les souris ont été testées 60 j après l'injection intrahippocampique de sérum physiologique (TEM) ou de 1 nmol de soman. Le test du labyrinthe en T permet l'étude du comportement d'alternance spontanée chez la souris et reflète l'activité de mémoire de travail (Section C, page 188). Le score d'alternance est représenté par le pourcentage d'alternances possibles. Aucun effet du soman n'a été mis en évidence. Le test du labyrinthe en croix surélevé n'a pas révélé d'effet du soman sur le nombre d'entrées dans le bras fermé, ni sur l'index d'anxiété. Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  ES des données individuelles de chaque groupe (n=15 par groupe).

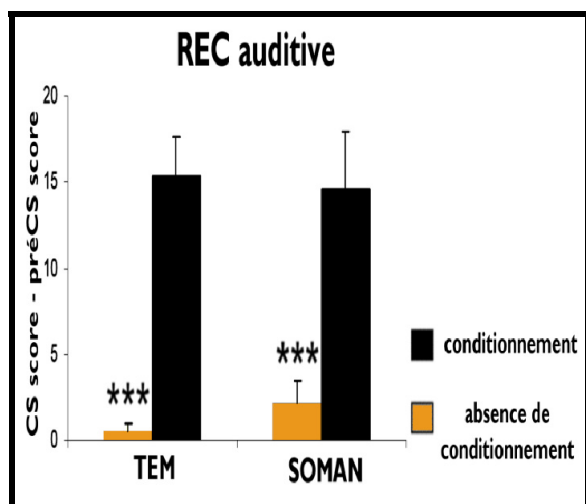
### *c. Réponse émotionnelle conditionnée*

#### **i. Apprentissage de l'association CS-US**

Le premier jour du test, tous les groupes ont montré des activités d'exploration et d'immobilité équivalentes avant l'association CS-US (données non illustrées). Après l'association CS-US, le taux d'immobilité est augmenté par le choc électrique (animaux conditionnés), comme attendu (données non illustrées).

#### **ii. REC auditive**

Aucune différence du temps d'immobilité entre les groupes ou les conditions n'a été observée durant la phase précédant l'occurrence du CS (phase préCS, deux premières minutes, données non illustrées). En revanche, les animaux préalablement conditionnés ont vu leur temps d'immobilité augmenté pendant la phase CS (deux dernières minutes), signe de l'apprentissage de l'association CS-US préalable ( $F(1,25) = 31.3$  ;  $p < 0.0001$ ), sans effet du soman sur le temps d'immobilité pour ce test.



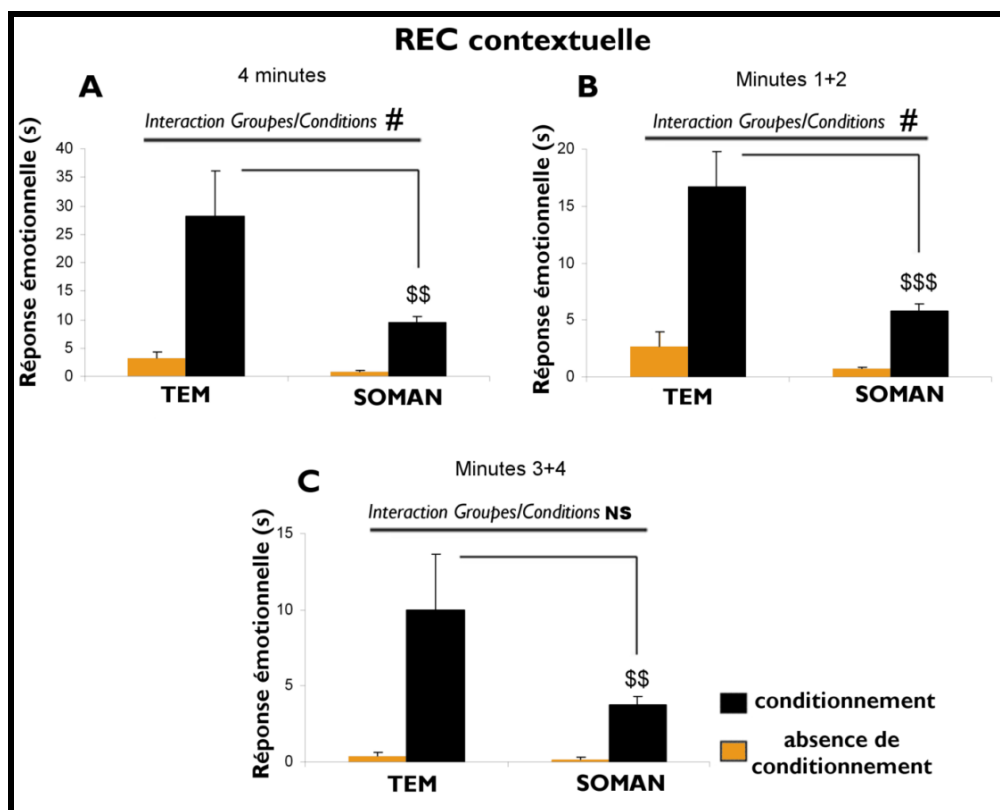
**Figure 29. Réponse émotionnelle conditionnée auditive 60 jours après l'injection intrahippocampique de 1 nmol de soman**

Les animaux ont été testés 60 j après l'injection intrahippocampique de sérum physiologique (TEM) ou de 1 nmol de soman. Le stimulus conditionnant auditif (CS) a augmenté le temps d'immobilité des animaux préalablement conditionnés, comme attendu et comme indiqué par l'index (CSscore - préCS score). Les animaux non conditionnés ont différé significativement des animaux conditionnés de leur groupe respectif (\*\*\*,  $p < 0,01$ ). Aucun effet du soman n'a été mis en évidence.

### iii.REC contextuelle

Durant la session entière de REC contextuelle (4 min), à la fois le conditionnement et le traitement ont eu un impact significatif sur le temps d'immobilité de l'animal (différence entre les groupes :  $F(1, 25)=7,7$  ;  $p=0,01$  ; entre les conditions :  $F(1, 25)=18,2$  ;  $p=0,0002$  ; et interaction entre les groupes et les conditions :  $F(1, 25)=4,32$  ;  $p < 0,04$ ). Comme attendu, le conditionnement a augmenté le temps d'immobilité, mais de façon intéressante, le soman a diminué significativement l'impact du conditionnement ( $9,5 \pm 1,0$  s contre  $28,1 \pm 7,9$  s, pour le groupe soman et TEM, respectivement :  $p < 0,002$  ; Figure 30A). De plus, les animaux conditionnés du groupe soman ont différé des animaux non conditionnés de ce même groupe ( $p > 0,10$ ). Le déficit de la REC contextuelle chez les animaux soman a été observé principalement durant les deux premières minutes de la session (interaction Groupes/Conditions :  $F(1, 25)=5,35$  ;  $p=0,02$  ; Figure 30B), alors qu'aucune différence significative n'a été observée durant les deux dernières minutes ( $F(1,25)=2,7$  ;  $p=0,1$  ; Figure 30C).

**Figure 30. Réponse émotionnelle conditionnée contextuelle 60 jours après l'injection intrahippocampique de soman (1 nmol)**



Les animaux ont été testés 60 j après l'injection intrahippocampique de sérum physiologique (TEM) ou de 1 nmol de soman. (A), réponse émotionnelle conditionnée (REC) contextuelle pendant les 4 min de la session ; (B), les deux premières minutes et (C), les deux dernières minutes. Les animaux conditionnés du groupe soman ont montré une forte diminution du temps d'immobilité suite au remplacement dans le contexte de l'association CS-US par rapport aux animaux conditionnés du groupe TEM (comparaison inter-groupe : \$\$,  $p < 0,01$  ; interaction groupes-conditions : #,  $p < 0,05$ ) ce qui indique un sévère déficit de la REC contextuelle 60 j après l'injection de soman. Le déficit est observé principalement durant les deux premières minutes de la session (B, C) (interaction groupes-conditions : #,  $p < 0,05$  ; NS, non significatif ; comparaison inter-groupes : \$\$,  $p < 0,01$  ; \$\$\$,  $p < 0,001$ ).

#### IV. Éléments de discussion

L'étude présentée ici démontre clairement qu'un processus d'épileptogénèse peut être associé à l'augmentation d'ACh endogène induite expérimentalement par l'injection intrahippocampique d'un puissant inhibiteur des ChE, le soman.

##### Induction d'un processus d'épileptogénèse

Les résultats expérimentaux obtenus avec la dose de 11 nmol indiquent des effets aigus très intenses, aboutissant au décès des animaux en l'absence d'un traitement antagoniste d'action périphérique, le NMA. Les convulsions s'initient rapidement et semblent similaires dans leur

expression clinique à celles rapportées avec l'injection systémique de soman. Ceci avait été également noté après l'injection de soman, avec la même dose, dans l'amygdale du rat alors que l'injection intrahippocampique était sans effet, même chez les animaux prétraités au lithium pour les sensibiliser à l'action du toxique (McDonough et coll., 1987). Cette distinction peut être liée à une différence interspèce ou plus simplement au rapport entre la quantité de soman administrée et le poids respectif des animaux. Notre résultat n'est cependant pas étonnant compte tenu du rôle majeur de la structure hippocampique dans le développement et la maintenance des crises limbiques (Turski et coll., 1989).

D'autre part, cette dose de 11 nmol a induit chez nos animaux des décharges récurrentes dans les semaines qui ont suivi l'administration indiquant la mise en place d'un processus d'épileptogénèse. Ce résultat n'est pas, lui non plus, surprenant compte tenu du SE initial observé avec cette dose. L'absence de lésions histopathologiques est quant à elle beaucoup plus surprenante, en raison de l'existence d'un SE initial, qui classiquement est associé à l'établissement de lésions cérébrales. Les raisons d'un tel résultat seront discutées plus tard.

La micro-injection intrahippocampique de doses plus faibles (4 ; 2,8 ; 2 ; 1 et 0,75 nmol) induit une inhibition des ChE sanguines, indiquant que le soman pourrait atteindre le compartiment sanguin et avoir une action périphérique délétère. Les dommages tissulaires induits par l'effraction de la canule, ainsi que les propriétés chimiques inhérentes au soman, comme sa forte lipophilie, peuvent expliquer une telle distribution périphérique. Toutefois, pour les doses inférieures ou égales à 1 nmol, l'inhibition constante n'est d'environ que de 15 à 20 % et d'autres causes pourraient être impliquées : l'utilisation de différents anesthésiques inhibant les ChE comme le chloral utilisé dans nos expérimentations (Brown, 1962) ou la variabilité associée à l'essai (Worek et coll., 1999).

Bien que ces faibles doses n'induisent pas de SE initial, nos résultats démontrent qu'une dérégulation focale du système cholinergique est suffisante pour induire un processus d'épileptogenèse chez la souris. Plus précisément, une dose seuil est suggérée puisque seules les souris injectées avec une dose égale ou supérieure à 0,75 nmol ont présenté des décharges paroxystiques récurrentes au cours des 12 semaines d'observation. Le temps de latence avant l'apparition des premières décharges semble être dose-dépendant, mais ceci doit être confirmé sur des groupes expérimentaux plus larges. Cette relation est également difficile à affirmer en raison d'une large variation de ce temps de latence, qui varie de 4 à 55 j pour les doses de 1 à 4 nmol. Les raisons d'une telle variabilité demeurent obscures et une étude précise des taux d'ACh extracellulaire pourrait donner des éléments de réponse. Les effets cholinergiques du soman résultent en effet de l'inhibition spécifique des ChE et non d'un effet cholinergique direct. Ainsi, les variations du temps de latence pourraient être attribuées aux fluctuations locales des quantités extracellulaires d'ACh, et peut-être à son taux de diffusion. Néanmoins, des résultats similaires ont été rapportés lors de l'administration systémique (Cavalheiro et coll., 1996) ou focale (Furtado et coll., 2002) d'un agoniste muscarinique direct, la pilocarpine, chez la souris, avec des temps de latence respectifs avant les premières décharges de 4 à 42 j et de 2 à 30 j. À titre de comparaison, l'injection intrahippocampique de KA induit chez la souris un temps de latence très constant compris entre 14 et 21 j avant l'apparition des premières crises (Riban et coll., 2002).

### **Altération initiale de la rythmogenèse hippocampique**

Chez les animaux intoxiqués avec les doses de 1 et 4 nmol sous anesthésie légère, l'absence d'activité épileptique initiale a été confirmée. Une chute transitoire de la puissance totale de l'EEG précède une augmentation graduelle durant le reste de l'étude (24 h) au sein de l'hippocampe ipsilatéral à l'injection, indiquant un effet biphasique de l'injection sur l'excitabilité de l'hippocampe. En parallèle, la micro-injection de soman aboutit à des



variations majeures de la rythmogenèse hippocampique ipsilatérale, une indication de l'impact de cette injection. L'activité oscillatoire rythmique est une caractéristique majeure du fonctionnement des réseaux neuronaux (Buzsaki et Draguhn, 2004) et une altération de la rythmogenèse a été observée chez les patients épileptiques (Diaz et coll., 1998), dans certains modèles animaux d'épilepsie (Chauviere et coll., 2009 ; Dugladze et coll., 2007 ; Klaassen et coll., 2006) ainsi que dans l'hippocampe « épileptique » *in vitro* (Stief et coll., 2007).

Dans notre étude, la bande  $\delta$  a été augmentée transitoirement ( $\approx 6$  h) suite à l'injection de soman. Chez l'homme, l'augmentation de puissance des fréquences lentes de l'EEG est corrélée au degré de conscience (Leon-Carrion et coll., 2008). Une telle augmentation est également notée suite à un TC sévère, et associée à un mauvais pronostic chez les patients comateux. Une augmentation soutenue dans le temps de la bande  $\delta$  a également été mise en évidence chez des animaux montrant des lésions cérébrales induites par l'injection systémique de soman (Carpentier et coll., 2001a ; Testylier et coll., 2007). Dans notre étude, et après l'injection, l'absence de crises initiales et d'altérations morphologiques détectables est cohérente avec le caractère très transitoire de l'augmentation de la puissance de cette bande de fréquences (Carpentier et coll., 2001a).

À l'inverse, les variations observées de la bande  $\theta$  ont été plus soutenues dans le temps (au moins 24 h après l'injection). Cette activité  $\theta$  prédominante pourrait être reliée à l'activation cholinergique des interneurons hippocampiques. En effet, les agonistes cholinergiques sont capables d'induire une activité  $\theta$  lorsqu'ils sont appliqués sur l'hippocampe *in vitro* (Konopacki et coll., 1987) et l'excitation cholinergique des interneurons (Behrends et Ten-Bruggencate, 1993 ; Pitler et Alger, 1992) pourrait jouer un rôle dans la synchronisation de cette activité (McMahon et coll., 1998).

Les variations de la bande  $\gamma$  ont été les plus transitoires. Des études EEG, effectuées après l'intoxication systémique de soman, ont montré qu'une diminution, ou l'absence de modification, de la puissance dans la bande  $\gamma$  était corrélée à l'initiation de crises EEG (Testylier et coll., 1999 ; Tonduli et coll., 1999). Nos observations (une augmentation transitoire de la bande  $\gamma$  sans initiation de crises EEG) sont en accord avec ces observations.

La plupart des modifications EEG observées (augmentation de la puissance relative des fréquences  $\delta$ ,  $\theta$  et  $\gamma$  ; diminution des fréquences  $\alpha$  et  $\beta$ ) correspondent à celles révélées chez le rat après l'administration de chlorpyrifos, un inhibiteur irréversible des ChE (Timofeeva et Gordon, 2001) ou après infusion locale de néostigmine, un inhibiteur réversible des ChE, dans l'hippocampe ou le striatum (Joosen et van Helden, 2007). Des rythmes EEG lents (vagues  $\delta$  et  $\theta$ ) ont été également décrits après l'administration intrahippocampique de pilocarpine chez le rat (Smolders et coll., 1997), suggérant que les altérations de la rythmogenèse observées dans notre étude sont initiées par l'ACh endogène et l'activation soutenue des récepteurs à l'ACh.

### **Une absence de neuropathie**

De façon intéressante et surprenante, même l'injection de 11 nmol, qui induit un SE initial, ne promeut pas de dommages détectables avec le marquage H&P dans l'hippocampe. Il est pourtant l'une des structures les plus sensibles aux dommages liés aux crises induites par les convulsivants comme le soman administré de façon systémique (McDonough et Shih, 1997). Les limitations de notre étude peuvent être liées au marquage H&P, incapable de révéler certaines formes de dommages neuronaux fins (modifications axonales, dendritiques, etc.) ou peut également provenir du fait que nous n'avons pas effectué d'analyse quantitative des cellules et que la disparition d'un faible nombre de neurones a pu rester inaperçu. Il est également possible qu'aucun événement neurodégénératif ne prenne place, comme suggéré

par l'utilisation d'approches plus sensibles comme le marquage argentique ou la détection immunohistochimique de la protéine NeuN. En effet, l'ACh n'est pas neurotoxique lorsqu'elle est injectée dans des régions cérébrales (Olney et coll., 1986 ; Sloviter et Dempster, 1985) ou appliquée sur des cultures neuronales (Mattson, 1989). Des études *in vitro* ont également démontré l'absence de neurotoxicité directe du soman (Wang et coll., 2008) malgré sa capacité à induire des événements paroxystiques sur des tranches d'hippocampe (Apland et coll., 2009 ; Harrison et coll., 2005). Bien que la perte neuronale soit associée au processus d'épileptogenèse dans certains modèles ou certaines conditions pathologiques, spécialement dans l'EMLT (Houser, 1999 ; Wasterlain et coll., 1993), il ne s'agit pas d'une condition *sine qua non*. Ainsi, des rats ayant reçus une injection systémique de KA ont présenté des crises récurrentes spontanées en l'absence de dommages hippocampiques (Buckmaster et Dudek, 1997 ; Sloviter, 1992). De même, et plus en rapport avec notre modèle d'intoxication, des modèles murins *knock-out* d'épilepsie idiopathique, dans lesquels le système cholinergique est affecté, ne montrent pas d'atteinte anatomique du système limbique (Klaassen et coll., 2006).

Les mécanismes responsables des décharges dans ce modèle d'épilepsie chronique restent à déterminer. Notamment, nous n'avons pas observé de modifications neuro-anatomiques susceptibles d'expliquer la récurrence des crises. En particulier, nous n'avons pas observé de bourgeonnement des fibres moussues par la coloration de Timm dans ce modèle, ce qui est plutôt en accord avec l'absence de perte neuronale constatée. L'importance de ces événements dans les mécanismes d'épileptogenèse est toutefois sujette à discussion (voir page 20 et 21). De façon intéressante, dans le modèle d'injection intrahippocampique de KA chez la souris, le bourgeonnement des fibres moussues se développe rapidement durant les deux premières semaines après l'injection et l'intensité de la coloration de Timm s'atténue ensuite graduellement. Ceci est en fait lié à la diminution du contenu en zinc des fibres

moussues et non à la disparition des fibres elles-mêmes (Mitsuya et coll., 2009). Pour tenir compte de cette possibilité, nous avons utilisé un anticorps contre un transporteur au zinc ( $ZnT_3$ ) dans le modèle de micro-injection intrahippocampique de soman, mais aucune différence n'a été observée avec la coloration de Timm. Ceci est donc bien en faveur de l'absence de bourgeonnement des fibres moussues dans ce modèle. Les effectifs étant réduits, il conviendrait de confirmer ces résultats préliminaires.

Nous avons également cherché à étudier les variations morphologiques des neurones 6 mois après l'injection de 11 nmol de soman par la technique de Golgi. Les résultats préliminaires ne semblent pas indiquer de modifications majeures. Les dendritopathies typiques de la maladie épileptique, « *windblown neurons* », au sein du GD (Scheibel et coll., 1974), ne semblent pas présentes, mais une étude plus approfondie est nécessaire. Cette technique pourrait également nous permettre de détecter d'autres atteintes structurales plus fines comme des variations dans le nombre et/ou la répartition des épines sur les arbres dendritiques des neurones. Une diminution du nombre de ces épines a été démontré durant la récurrence de crises faisant suite à l'injection intrahippocampique de toxine tétanique (Jiang et coll., 1998), ainsi qu'immédiatement après le SE induit par l'intoxication systémique de soman (Carpentier et coll., 1991).

Nous avons observé une réponse astrocytaire dans l'hippocampe suite à l'injection de soman dans cette structure. La gliose réactive est une caractéristique de nombreux modèles d'épilepsie et est aussi constatée chez les patients épileptiques atteints d'EMLT (Engel, 1996). Cette réaction des astrocytes accompagne généralement le développement de dégradations tissulaires et cellulaires, dont celles associés au SE induit par l'injection systémique de soman (Baille-Le Crom et coll., 1995; Zimmer et coll., 1997). De telles modifications n'ont pas pu être mises en évidence dans notre étude. D'autres signaux doivent donc être impliqués. L'ACh pourrait être un mécanisme déclencheur car les astrocytes

possèdent des récepteurs cholinergiques (Hosli et Hosli, 1988). Plus précisément, il a été démontré que les astrocytes hippocampiques sont rendus excitables par l'activation muscarinique (Araque et coll., 2002). La réaction astrogliale observée dans notre étude pourrait être également en lien avec l'activité neuronale paroxystique récurrente, comme constaté dans un modèle d'épilepsie par embrasement caractérisé par l'absence de neurodégénérescence (Khurgel et coll., 1995).

Globalement, nos résultats indiquent que l'épileptogenèse déclenchée par l'injection intrahippocampique de soman se développe dans un environnement neuro-inflammatoire de faible intensité, ce qui est en accord avec la faible transcription des marqueurs inflammatoires étudiés. Ceci contraste fortement avec la cicatrice gliale et les importantes altérations des gènes impliqués dans la neuro-inflammation qui font suite à la micro-injection intrahippocampique de KA (voir Étude II, page 120 et 129). Les résultats obtenus avec le modèle de micro-injection intrahippocampique de soman ne sont donc pas en faveur d'un rôle potentiel de la neuro-inflammation dans l'épileptogenèse, comme cela a été suggéré antérieurement (Ravizza et coll., 2008 ; Vezzani et Granata, 2005). Il est important de noter que dans la plupart des modèles d'épilepsie, la réaction neuro-inflammatoire accompagne généralement des altérations neuropathologiques. Cette double réponse ne permet pas de distinguer aisément l'implication de chacun des deux processus dans les mécanismes d'épileptogenèse (voir Synthèse des résultats, page 152).

### **Un schéma d'activation neuronal atypique**

La méthode histochimique utilisée pour évaluer l'inhibition des ChE sur coupes de tissus est relativement grossière et ne permet pas d'évaluer la possible existence d'une inhibition discrète à distance du site d'injection du soman. Toutefois, nos observations permettent

d'affirmer que l'inhibition induite par la micro-injection intrahippocampique de soman reste très majoritairement confinée à l'hippocampe dorsal ipsilatéral et aux régions avoisinantes.

Le marquage de la protéine Fos a été initialement restreint aux cellules granulaires du GD ipsilatéral, suggérant une activation précoce de ces cellules, comme décrit précédemment après l'administration systémique de KA (Willoughby et coll., 1997). Dans notre cas, ce message initial pourrait être en lien avec le stress hypercholinergique engendré, car l'ACh et les agonistes cholinergiques induisent une augmentation de l'excitabilité neuronale dans cette région (Cole et Nicoll, 1984 ; Dodd et coll., 1981 ; Halliwell et Adams, 1982). Dans les heures qui suivent l'injection, l'induction initiale s'est ensuite propagée à certaines aires extrahippocampiques (cortex piriforme, amygdale et cortex cingulaire). Alors qu'après l'injection systémique de soman, le cortex piriforme, l'amygdale et le cortex cingulaire sont les premières zones à exprimer de façon stable Fos (Baille Le Crom et coll., 1996 ; Zimmer et coll., 1997), nos résultats ont montré au contraire son induction transitoire et retardée dans ces zones. Les connexions cholinergiques de l'hippocampe, et l'effet modulateur de l'ACh sur les neurotransmetteurs hippocampiques pouvant activer des régions distantes du cerveau, pourraient être impliqués (Hasselmo et Giocomo, 2006 ; Leranath et Hajszan, 2007).

Les couches CA1/CA3 et le néocortex ont été les plus intensément marqués à 12 h. La concentration importante d'ACh résultant de l'inhibition des ChE pourrait avoir participé à l'activation retardée de ces cellules pyramidales. En effet, l'application d'ACh sur des cellules pyramidales *in vitro* résulte en une inhibition latente, suivie d'une augmentation progressive de l'excitabilité (McCormick et Prince, 1985). De même, une activation cholinergique des interneurons produit une inhibition des cellules pyramidales suivie par un rebond d'excitabilité (Ji et Dani, 2000).

La chute progressive au cours du temps du nombre de cellules Fos-positives était attendue. En effet, la demi-vie de la protéine a été estimée à 2-6 h après une induction aiguë (Kaczmarek et coll., 2002 ; Morgan et Curran, 1989). Ceci tend à confirmer l'existence d'une période silencieuse d'épileptogénèse dans notre modèle, durant laquelle aucune décharge ne viendrait favoriser la production de Fos. En se basant sur les résultats de l'étude EEG avec la dose de 1 nmol montrant que 80 % des animaux présentent des crises quatre semaines post-injection (voir Tableau 2), la détection de la protéine Fos 28 j post-injection résulte probablement de l'apparition de décharges spontanées. Cependant, dans le modèle d'épilepsie caractérisé par l'injection systémique de pilocarpine chez le rat, les crises récurrentes ne sont pas capables de provoquer une forte expression de la protéine Fos (Harvey et Sloviter, 2005 ; Mello et coll., 1996). Un des paramètres clés pourrait être l'intervalle de temps entre la crise et l'analyse de la protéine (Peng et Houser, 2005).

### **Des déficits fonctionnels modestes et sélectifs**

Deux mois après la micro-injection de la dose de 1 nmol de soman, après la fin de la période silencieuse et pendant la récurrence des décharges paroxystiques, notre étude révèle de modestes déficits fonctionnels, en accord avec la faiblesse des autres variations constatées. Ceci contraste avec les modifications majeures observées après une intoxication systémique sévère (Coubard et coll., 2008). Dans un modèle plus proche du nôtre, l'injection intrahippocampique de KA a été associée à un déficit de mémoire (Groticke et coll., 2008). Nous n'avons pas constaté de tels résultats dans notre modèle. Dans le cas du KA, l'initiation d'un SE et l'impact excitotoxique sur la structure hippocampique (Ben-Ari et Cossart, 2000) expliquent probablement cette différence.

Nous montrons également ici que les modifications neurobiologiques induites par le soman, en particulier le processus d'épileptogénèse, entraînent un déficit sévère de la REC

contextuelle tout en épargnant la REC auditive. Ces résultats sont en faveur d'un déficit de la fonction hippocampique dans ce modèle. En effet, l'importance de l'hippocampe dans la REC contextuelle a été clairement établie dans des modèles de lésions hippocampiques électrolytiques (Phillips et Le Doux, 1992 ; 1994). Il a été toutefois également rapporté que des lésions hippocampiques d'origine excitotoxique pouvaient épargner la REC contextuelle (Cho et coll., 1999). Les raisons de ces différences ne sont pas clairement établies. La présence d'un déficit fonctionnel hippocampique en l'absence d'événements neurodégénératifs dans cette structure est très intéressante. En fait, une telle dissociation a déjà été rapportée dans un modèle d'épilepsie induite par l'injection systémique de pilocarpine chez le rat ; où le déficit de la REC, constaté pendant la phase chronique de récurrence des crises, a pu être épargné par l'injection de kétamine, un antagoniste des récepteurs NMDA, pourtant sans action neuroprotectrice jugée par l'histologie (McKay et Persinger, 2004). La scopolamine, un antagoniste muscarinique, entraîne un déficit sélectif de la REC contextuelle chez le rat, sans atteinte de la REC auditive, après injection systémique (Anagnostaras et coll., 1995) ou intrahippocampique (Gale et coll., 2001; Wallenstein et Vago, 2001). Le déficit sélectif constaté dans notre modèle pourrait ainsi traduire une perturbation de la neurotransmission cholinergique hippocampique à long terme suite à l'injection intrahippocampique de soman chez la souris. Cette hypothèse devra être étudiée dans des études ultérieures.

En conclusion, cette étude rapporte les conséquences neurobiologiques d'une dérégulation cholinergique initiale et focale et démontre clairement la mise en place d'une épiléptogénèse. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec les informations cliniques rapportant des crises retardées sous traitement anti-cholinestérasique ou durant des maladies neurologiques chroniques impliquant des dysfonctionnements cholinergiques. Les bases neurobiologiques de l'épileptogénèse dans ce modèle murin requièrent de plus amples investigations.



## **Étude II**

### **Réaction neuro-inflammatoire au cours de l'épileptogenèse induite par la micro- injection intrahippocampique de kaïnate chez la souris**

## **I. Introduction et objectifs**

La neuro-inflammation chronique est une marque constante de plusieurs pathologies neurologiques, comme le TC sévère et certaines formes d'épilepsie, notamment dans le syndrome d'EMLT, une des formes les plus communes d'épilepsie focale. Cette forme d'épilepsie, souvent résistante aux anti-épileptiques classiques, semble associée à un événement précipitant comme des crises fébriles néonatales ou des infections cérébrales, suivie d'une phase silencieuse, précédant l'occurrence de crises récurrentes, plusieurs années plus tard. Cette période de latence est associée à différentes modifications moléculaires et cellulaires aboutissant à l'activation et au développement des circuits générateurs de crises. Parmi ces différents mécanismes, la neuro-inflammation apparaît comme un des plus importants (de Lanerolle et Lee, 2005 ; Vezzani et Granata, 2005)

Comme rappelé dans l'introduction bibliographique, l'inflammation cérébrale est caractérisée par une activation gliale, un œdème et la synthèse de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines et les eicosanoïdes. Plusieurs travaux ont démontré que certaines cytokines comme l'IL-1 $\beta$ , ou certaines enzymes de la voie des eicosanoïdes comme COX-2, jouent un rôle majeur dans la pathophysiologie de l'épilepsie et pourraient constituer de nouvelles cibles pour moduler le développement de la maladie (de Simoni et coll., 2000 ; Dube et coll., 2005 ; Farooqui et coll., 2006 ; Kawaguchi et coll., 2005 ; Vezzani et Baram, 2007 ; Virta et coll., 2002).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'implication des phénomènes neuro-inflammatoires durant la phase d'épileptogénèse, en utilisant un modèle animal d'EMLT caractérisé par l'injection unilatérale de KA dans l'hippocampe dorsal droit de la souris. Les phénomènes neuro-inflammatoires au cours de l'épileptogénèse dans ce modèle sont encore

peu documentés et en particulier, des études intégrées visant à explorer les événements géniques, moléculaires et cellulaires manquent encore à ce jour.

Après une étude descriptive du développement spatio-temporel des événements cellulaires, nous avons cherché à moduler la réaction neuro-inflammatoire pour observer l'impact sur l'épileptogenèse et le développement de la SH. Dans un premier temps, nous avons cherché à favoriser la neuro-inflammation par l'injection systémique préalable de lipopolysaccharide bactérien (LPS). Dans un second temps, afin d'explorer les rôles possibles des eicosanoïdes dans le développement de l'épileptogenèse, nous avons bloqué leur production par une injection unique de celecoxib, un anti-inflammatoire non stéroïdien inhibiteur de COX-2, 2 h après l'injection de KA. Finalement, pour caractériser plus finement la réaction neuro-inflammatoire, nous nous sommes intéressés aux variations de quantités d'ARNm codant pour IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, SOCS3, COX-2 et cPLA<sub>2</sub> dans l'hippocampe ainsi que dans certaines structures extrahippocampiques dans ce modèle.

### **Objectifs**

- 1) Caractériser la cinétique des événements cellulaires au cours de l'épileptogenèse suite à la micro-injection intrahippocampique de KA chez la souris**
- 2) Etudier les conséquences d'une modulation de la réponse neuro-inflammatoire sur le développement de l'épilepsie et les événements cellulaires associés**
- 3) Définir dans le temps et l'espace les variations des quantités d'ARNm codant pour des médiateurs neuro-inflammatoires pouvant être associés au processus d'épileptogenèse**

## **II. Protocoles d'étude**

### **II.1. Caractérisation du développement de la maladie épileptique**

Afin de vérifier le développement de crises récurrentes chez la souris après micro-injection intrahippocampique de KA réalisée sous anesthésie à l'hydrate de chloral (Section C, page 164), l'EEG de six souris a été recueilli durant la première, deuxième et troisième semaine post-injection. Après perfusion-fixation des cerveaux, une analyse histologique a été effectuée 30 j après l'injection sur des coupes adjacentes de la région dorsale de l'hippocampe (~1 mm à -3 mm à partir du bregma selon l'axe rostro-caudal), d'après Paxinos et Franklin (2001) : détection de l'architecture hippocampique et des processus neurodégénératifs par la coloration H&P (voir page 175) ; révélation de l'activation microgliale par marquage histochimique à la lectine GSA-IB4 (voir page 175) ; mise en évidence de la réaction astrocytaire par détection immunohistochimique de la protéine GFAP (voir page 176).

### **II.2. Cinétique des événements cellulaires durant l'épileptogénèse**

Suite à la micro-injection intrahippocampique de KA (KA) ou de sérum physiologique (TEM), des souris ont été sacrifiées 48 h, 3, 7, 14 et 21 j après l'injection (n=5 par temps et par groupe). Après perfusion-fixation des cerveaux, une analyse histologique de l'architecture neuronale, de la réactivité astrocytaire et de l'activation microgliale a été effectuée comme décrit dans l'expérimentation précédente.

La présence d'événements neurodégénératifs par un marquage argentique (Section C, page 176) et l'activation cellulaire par la détection immunohistochimique de la protéine Fos (Section C, page 177) ont été étudiés sur des coupes flottantes de tissus perfusés (Section C, page 173) 12 et 48 h après l'injection de KA (n=2 par temps).

## **II.3. Effets de la modulation inflammatoire sur le processus d'épileptogénèse**

### ***II.3.1. Activation neuro-inflammatoire par le lipopolysaccharide bactérien***

Le LPS est une endotoxine bactérienne reconnue pour stimuler le système immunitaire à travers l'activation des macrophages au niveau des tissus périphériques. L'injection systémique de LPS produit une réponse complexe introduisant des composantes immunes, endocrines, comportementales et métaboliques connue sous le nom de « réponse aiguë ». Fièvre ou hypothermie, baisse de l'activité locomotrice, stimulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire sont les événements caractéristiques de ce syndrome chez les rongeurs (Dogan et coll., 2000 ; Hart, 1988 ; Rothwell, 1997). Le LPS ne franchissant pas la BHE, même à fortes doses dans les conditions physiologiques, il produirait son action en activant des cellules immunocompétentes périphériques qui secrèteraient alors diverses cytokines pro-inflammatoires (Bickel et coll., 1998; Blanque et coll., 1996 ; Quan et coll., 1994 ; Rothwell, 1997). Ces cytokines stimulent la production de facteurs spécifiques comme IL-1 et IL-6 au sein du SNC par les cellules gliales notamment, qui initient ou maintiennent le syndrome de réponse aiguë. L'administration centrale ou périphérique de LPS est ainsi un bon modèle d'induction neuro-inflammatoire (Haus-Wegrzyniak et coll., 2000; Hetier et coll., 1990 ; Lee et coll., 1993 ; Liu et coll., 2000a ; Liu et coll., 2000b ; Matoh et coll., 2000 ; Turrin et coll., 2001).

Nos expérimentations ont pour but d'évaluer le caractère bénéfique ou délétère d'une neuro-inflammation exacerbée sur l'épileptogénèse dans notre modèle d'étude.

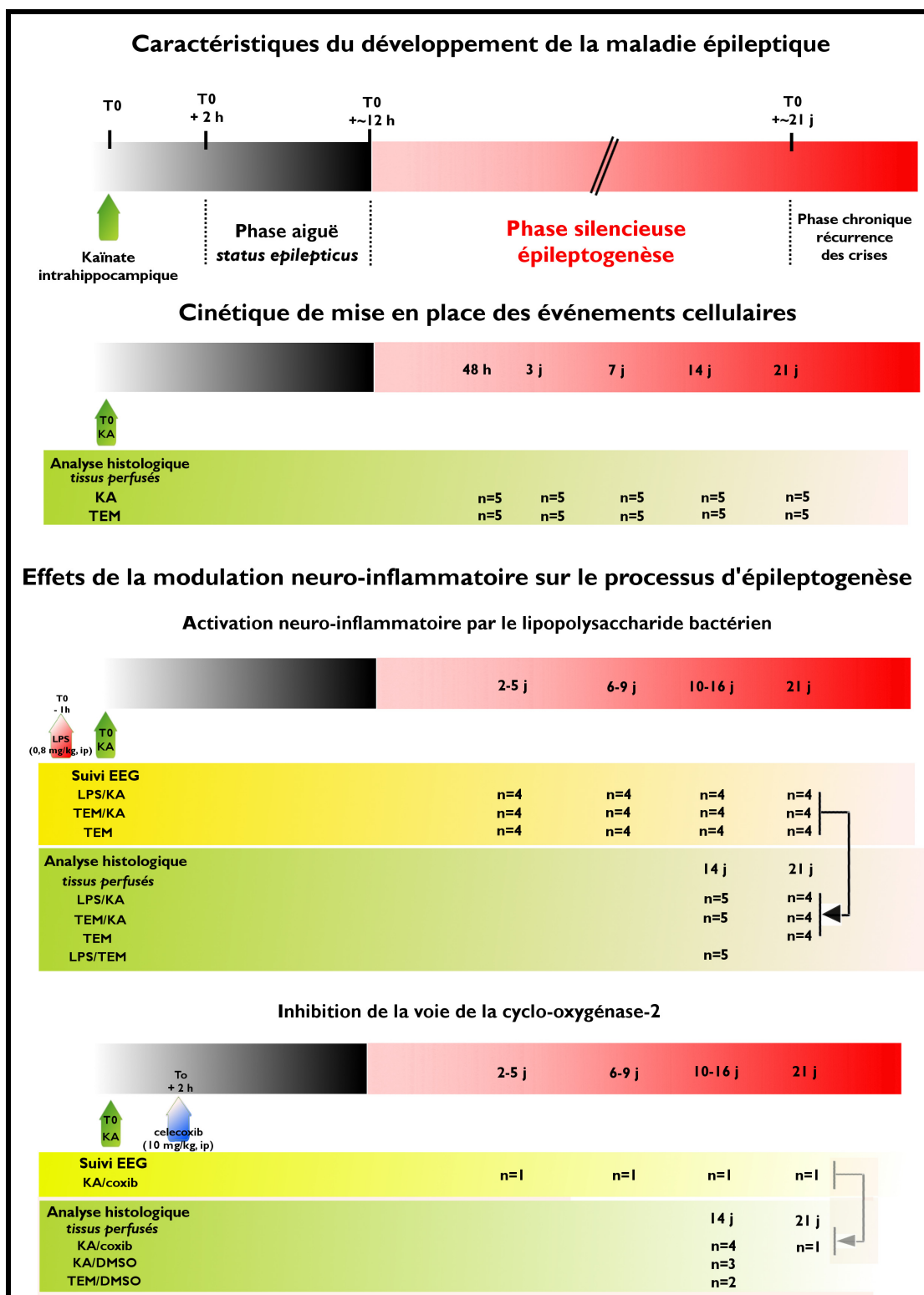
Le LPS (Section C, page 196) a été injecté (0,8 mg/kg, ip) 1 h avant l'injection intrahippocampique de KA (LPS/KA, n=9) ou de sérum physiologique (LPS/TEM, n=5). Un autre groupe témoin a été constitué d'animaux injectés avec du sérum physiologique 1 h

avant l'injection de KA (TEM/KA, n=9). Un quatrième groupe correspond à des animaux ayant reçus une injection intrahippocampique de sérum physiologique (TEM, n=4).

Le processus d'épileptogenèse a été étudié par analyse EEG chez des animaux de ces lots (TEM, n=4 ; LPS/KA, n=4 ; TEM/KA, n=4), à l'exception du groupe LPS/TEM, pendant 21 j à raison d'1-2 h par jour et un intervalle entre les sessions d'enregistrement de 3-4 j (voir Section C, page 197).

Une analyse histologique de l'architecture neuronale par coloration H&P et de la réactivité astrocytaire par détection immunohistochimique de GFAP a été effectuée sur tissus perfusés-fixés à la fin de l'étude EEG chez tous les animaux (21 j post-injection). Une analyse quantitative des pertes cellulaires a été effectuée (voir Section C, page 198). L'épaisseur de la couche granulaire du GD a également été déterminée sur ces mêmes coupes. Un contrôle qualitatif histologique a également été effectué chez d'autres animaux 14 j après l'injection de KA (LPS/KA, n=5 ; LPS/TEM, n=5 ; TEM/KA, n=5).

Figure 31. Protocoles d'étude de la réaction neuro-inflammatoire au cours de l'épileptogénèse



### ***II.3.2. Inhibition de la voie de la cyclo-oxygénase-2***

Afin de confirmer la présence probable de COX-2 dans ce modèle d'épileptogenèse, nous avons effectué une analyse immunohistochimique préliminaire de détection de cette protéine sur des coupes de tissu hippocampique perfusé-fixé d'animaux sacrifiés 48 h (n=2) et 3 j (n=1) après l'injection de KA ou 3 j après l'injection de sérum physiologique (TEM, n=1).

Le celecoxib (voir page 195) ou son solvant (diméthylsulfoxyde, DMSO) a été administré (10 mg/kg, ip) 2 h après l'injection de KA (KA/Coxib, n=9 ; KA/DMSO, n=4). Afin d'étudier l'impact propre du solvant, deux animaux ont été injectés avec le DMSO après l'injection intrahippocampique de sérum physiologique (TEM/DMSO, n=2).

Le traitement par le celecoxib ayant exacerbé le SE et réduit fortement la survie des animaux (voir Résultats, page 128), l'analyse EEG (pendant 21 j selon le même protocole que dans l'étude précédente) n'a pu être effectuée que sur un seul animal du lot KA/coxib. Les données d'épileptogenèse ont été comparées pour cet animal aux animaux des lots TEM et TEM/KA précédemment définis (n=4 par groupe, voir page précédente).

L'analyse histologique a été effectuée à la fin de la dernière session d'enregistrement EEG chez l'animal survivant (21 j post-injection, KA/coxib, n=1) et a consisté en l'étude des événements neurodégénératifs par coloration H&P ainsi que la réactivité astrogliale par détection immunohistochimique de GFAP sur des coupes adjacentes. Un contrôle histologique a également été effectué chez d'autres animaux 14 j après l'injection intrahippocampique de KA (KA/coxib, n=3 ; KA/DMSO, n=4 ; TEM/DMSO, n=2) sur ces mêmes marqueurs.



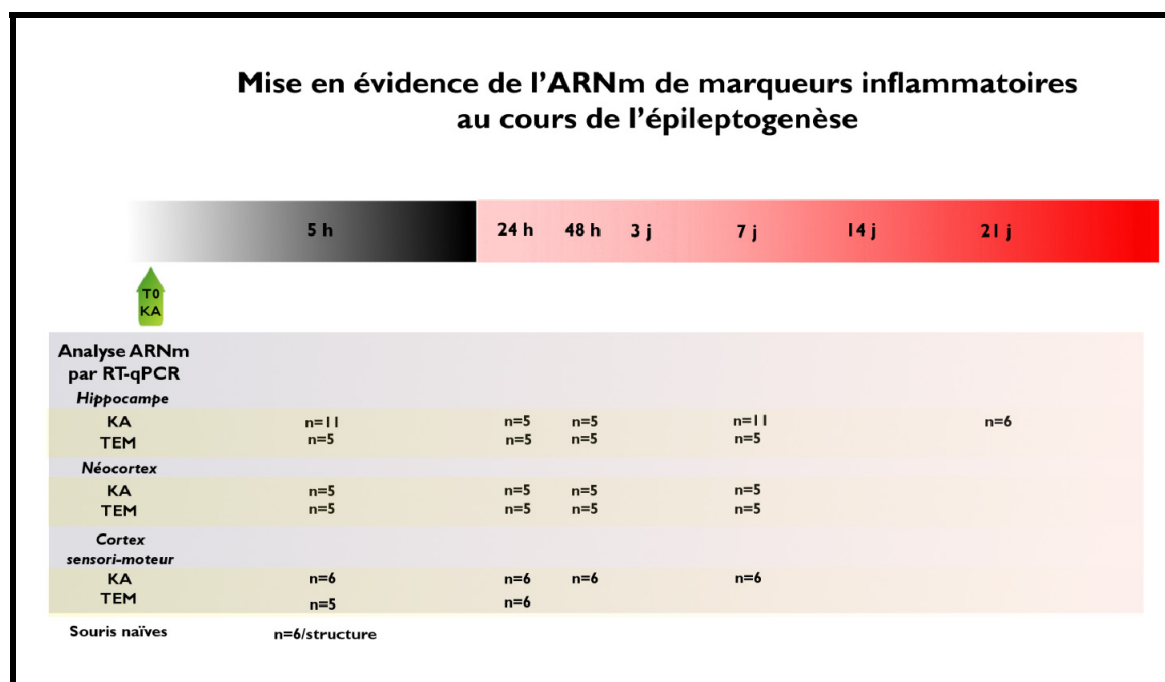
#### **II.4. Mise en évidence de l'ARNm de marqueurs inflammatoires au cours de l'épileptogenèse**

Afin de compléter les données sur l'activation cellulaire, nous nous sommes intéressés aux variations d'ARNm codant pour des facteurs impliqués dans la réponse neuro-inflammatoire. Ces facteurs peuvent être libérés par les cellules astrocytaires et microgliales dont l'activation a été mise en évidence précédemment (voir Résultats, page suivante).

Suite à la micro-injection intrahippocampique de KA (KA) ou de sérum physiologique (TEM), des souris ont été sacrifiées 5 h, 1, 2 et 7 j après l'injection. Des animaux naïfs (NV) ont également été inclus pour cette étude (5 h après l'induction anesthésique, n=6).

Les structures cérébrales ont été disséquées comme indiqué page 171 et Figure 47. Chez tous les animaux, les hippocampes ipsi- et controlatéraux ont été prélevés. En revanche, soit le néocortex total, soit le néocortex sensori-moteur a été recueilli. Deux temps ont été privilégiés pour l'étude au sein de l'hippocampe : 5 h pour les événements très précoces et 7 j pour des événements se déroulant alors que la réaction cellulaire (astroglie) est importante. Enfin, l'hippocampe étant la structure la plus modifiée dans ce modèle, nous avons complété l'étude dans cette structure par des prélèvements effectués à 21 j, période de fin d'épileptogenèse probable (n=6). La constitution des lots est indiquée Figure 31.

**Figure 32. Protocoles d'étude de l'étude RT-qPCR au cours de l'épileptogénèse**



### III. Résultats

#### III.1. Caractérisation du développement de la maladie épileptique

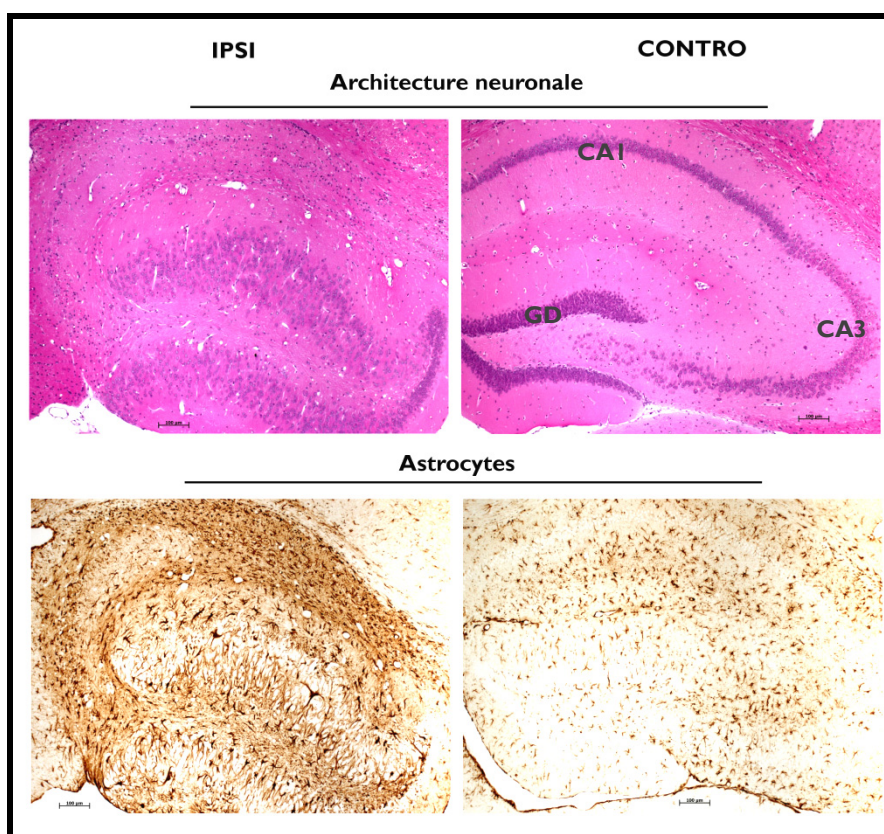
Au sortir de l'anesthésie, l'injection avec le KA a induit chez la majorité des animaux (4/6), des mouvements cloniques des pattes avant, des rotations ainsi que des phases d'immobilité. Seuls les animaux avec ces signes caractéristiques ont présenté des crises spontanées et récurrentes à l'EEG 21 j après la micro-injection intrahippocampique de KA (données non illustrées). Ce comportement particulier avait déjà été associé au développement de crises récurrentes à long terme (Bouilleret et coll., 1999; Riban et coll., 2002). Pour les expérimentations ultérieures, seuls les animaux présentant ce comportement initial caractéristique ont été inclus dans notre étude.

Nous avons également pu confirmer lors de ces mêmes expérimentations des résultats antérieurs (Bouilleret et coll., 1999 ; Riban et coll., 2002) : une fois épileptique, les souris ont présenté les caractéristiques de la SH proches de celles observées chez les patients atteints

d'EMLT, à savoir une perte sélective de neurones, une dispersion des cellules granulaires du GD ainsi qu'une accumulation d'astrocytes réactifs au sein de l'hippocampe ipsilatéral (n=4, Figure 33).

Nous avons alors décidé de compléter les données sur la cinétique de certains événements cellulaires (mort neuronale, dispersion des cellules granulaires du GD, astrocytose et activation microgliale) pendant la phase d'épileptogénèse.

**Figure 33. Confirmation de la sclérose hippocampique unilatérale suite à la micro-injection intrahippocampique de KA chez la souris**



Trente jours après l'injection unilatérale de KA dans l'hippocampe dorsal droit de souris, et après vérification EEG de la présence de décharges hippocampiques récurrentes, nous avons constaté une perte importante de neurones au sein de la CA et du hile dans l'hippocampe ipsilatéral à l'aide de la coloration H&P. Cette atteinte était associée à un élargissement de la couche des cellules granulaires du GD et une cicatrice astrogliale importante détectée par immunohistochimie GFAP (n=4). Abréviations : CA, corne d'Ammon ; GD, gyrus denté ; ipsi, hippocampe ipsilatéral ; contro, hippocampe controlatéral. Barre d'échelle, 100  $\mu$ m.

## **III.2. Cinétique des événements cellulaires au cours de l'épileptogénèse**

### ***III.2.1. Neurodégénérescence sélective de neurones hippocampiques***

Aucun processus neurodégénératif n'a été constaté dans l'hippocampe ipsilatéral des souris TEM en dehors du trajet de la canule d'injection (n=25, Figure 34). De même, aucune neurodégénérescence n'a été observée dans l'hippocampe controlatéral des souris KA (n=25, données non illustrées). En revanche, une dégénérescence des neurones des couches CA1, CA3 ainsi que du hile était visible dès 48 h après l'injection dans l'hippocampe ipsilatéral (n=5, non illustré). Les cellules granulaires du GD ont semblé être épargnées. Un infiltrat œdémateux, localisé majoritairement dans la zone CA1 a également été mis en évidence dès 48 h et a persisté jusqu'à 3 j (n=5, Figure 34). Les processus neurodégénératifs étaient encore intenses chez les souris KA à 7 j de l'injection (n=5, Figure 34). Le nombre de cellules lésées visibles en H&P est resté important chez les souris à 14 j bien que diminué (n=5, non illustré). A 21 j, une perte massive des neurones a été observée dans ces régions, associée à une dispersion importante des cellules granulaires du GD (n=5, Figure 34).

### ***III.2.2. Microgliose réactionnelle dans l'hippocampe***

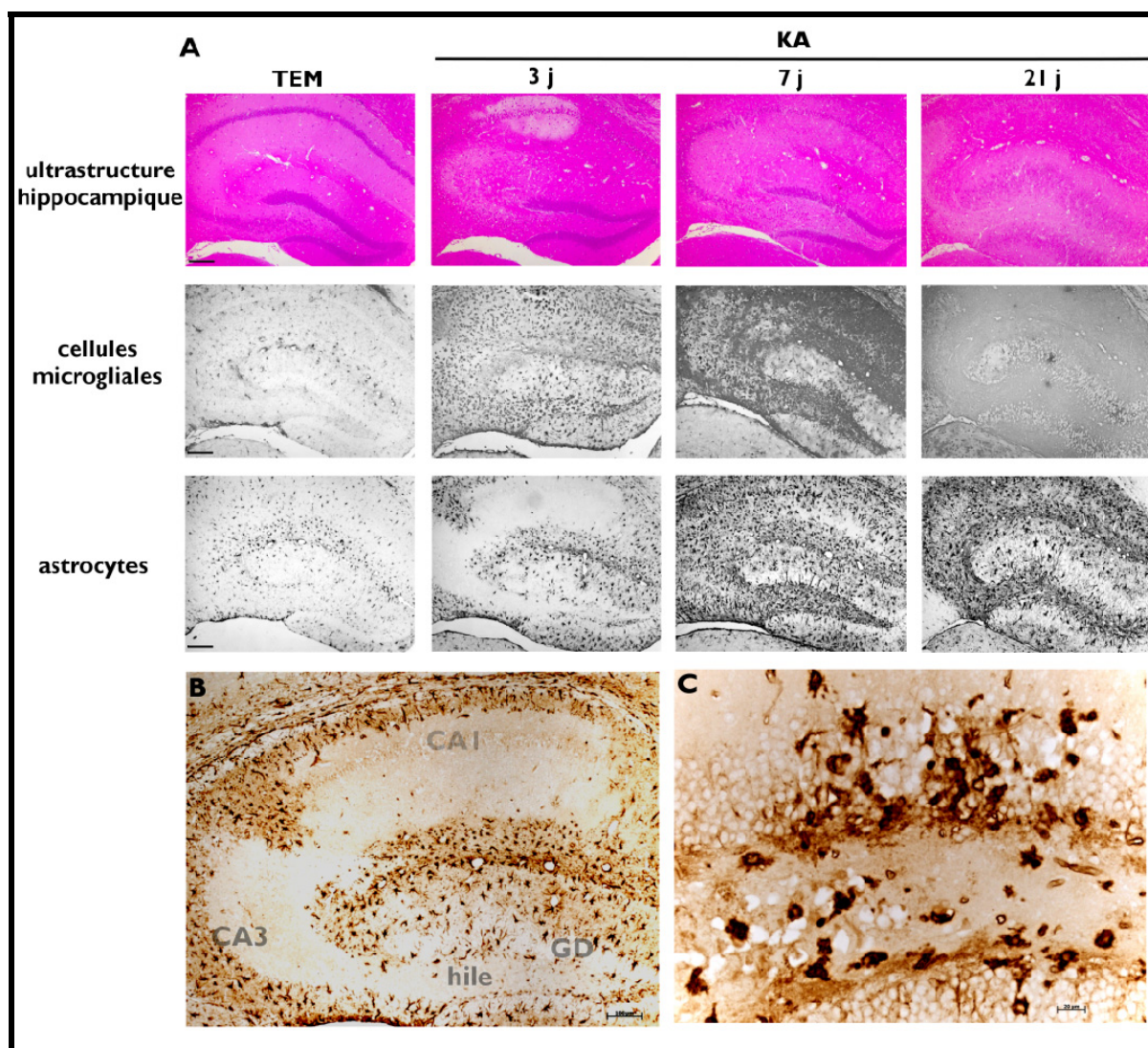
Chez les souris TEM, les cellules GSA-positives sont apparues faiblement marquées, avec des ramifications nombreuses et fines, et distribuées de façon homogène dans l'hippocampe ipsi- et controlatéral (n=25, Figure 34). Deux jours après l'injection de KA, les cellules présentaient un corps hypertrophié et de courtes ramifications. De nombreuses cellules de formes rondes, améboïdes, ont été également observées à ce temps d'étude (n=5, données non illustrées). Le stade d'activation maximale a été noté 3 j après le SE induit par le KA où les cellules étaient majoritairement présentes dans les zones neurodégénératives de l'hippocampe ipsilatéral, à savoir le hile et les couches cellulaires de la CA (n=5, Figure 34). Au-delà de ce temps (7 j, n=5 ; 14 j, n=5 et 21 j, n=5), nous avons observé un stade

particulier durant lequel un marquage diffus empêchait de discerner une morphologie cellulaire (Figure 34). Dans l'hippocampe controlatéral, le marquage à la lectine a révélé un faible nombre de cellules, exhibant des ramifications fines, ou un corps cellulaire plus dense, caractéristique de l'état réactif (n=25, données non illustrées).

### ***III.2.3. Astroglie réactionnelle dans l'hippocampe***

Chez les souris TEM, nous avons observé des cellules faiblement marquées et distribuées de façon homogène dans l'hippocampe (n=25, Figure 34). Une forte augmentation de l'intensité du marquage et de la taille apparente des astrocytes a été détectée dès 2 j après l'injection de KA (n=5, données non illustrées). À ce même temps d'étude ainsi qu'à 3 j, nous avons observé une absence d'immunoréactivité GFAP à proximité des zones associées à une forte neurodégénérescence comme CA1 et CA3 ainsi qu'au niveau du hile (n=5, Figure 34). Par la suite, de nombreuses cellules GFAP-positives ont été détectées 7 j (n=5) et 14 j (n=5) après la micro-injection intrahippocampique de KA. Une importante cicatrice astrogliale a été détectée à 21 j (n=5, Figure 34). Dans l'hippocampe controlatéral, nous avons noté durant les premiers temps d'étude un nombre important de cellules marquées et clairement hypertrophiées par rapport au groupe TEM (données non illustrées).

Figure 34. Profil temporel de la neurodégénérescence et de l'inflammation cérébrale



(A), l'évolution des événements neurodégénératifs et sa relation avec l'activation gliale (cellules microgliales et astrocytes) est décrite dans cette figure. Les événements neurodégénératifs ont été détectés par un marquage H&P chez les souris injectées dans l'hippocampe dorsal droit avec du sérum physiologique (TEM) ou avec du KA. L'activation des cellules gliales a été étudiée sur des coupes sériées à l'aide d'un marquage histochemique par la lectine GSA-IB4 pour les cellules microgliales et un immunomarquage de la protéine GFAP pour les astrocytes. (B), 3 j après l'injection de KA, une zone non réactive à l'anticorps GFAP a été observée autour des zones neurodégénérantes de l'hippocampe. (C), le stade d'activation maximale des cellules microgliales a été observé à 3 j post-injection : les cellules GSA-positives, améboïdes, sont principalement détectées à proximité des zones neurodégénératives, ici à proximité du hile. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

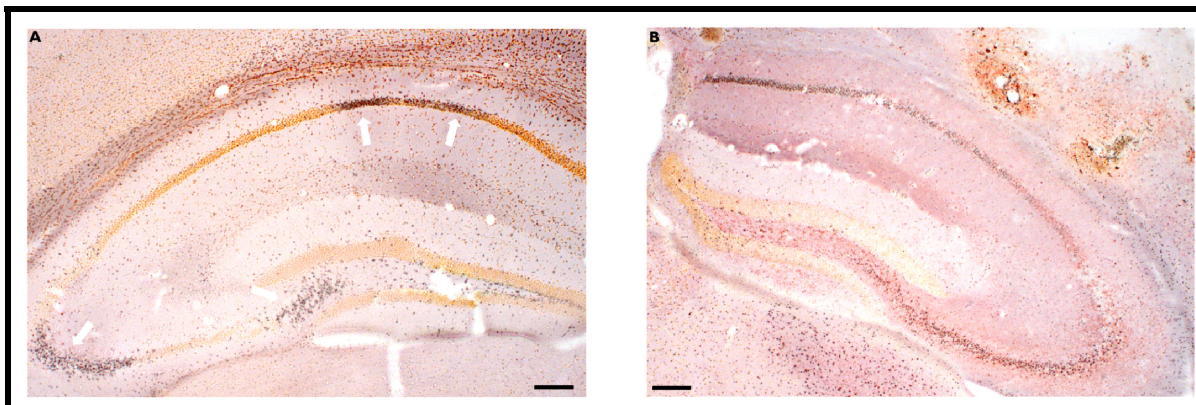
### III.2.4. Études préliminaires

#### a. Neurodégénérescence par marquage argentique

Après l'injection intrahippocampique de KA, aucun processus neurodégénératif n'a été détecté dans l'hippocampe controlatéral des animaux (n=4, données non illustrées). En revanche, le marquage argentique a révélé de nombreuses cellules dégénérantes dès 12 h dans

les couches CA1, CA3 ainsi que dans le hile de l'hippocampe ipsilatéral (n=2, Figure 35), plus nombreuses à 48 h (n=2, Figure 35).

**Figure 35. Détection d'une neurodégénérescence précoce par marquage argentique**



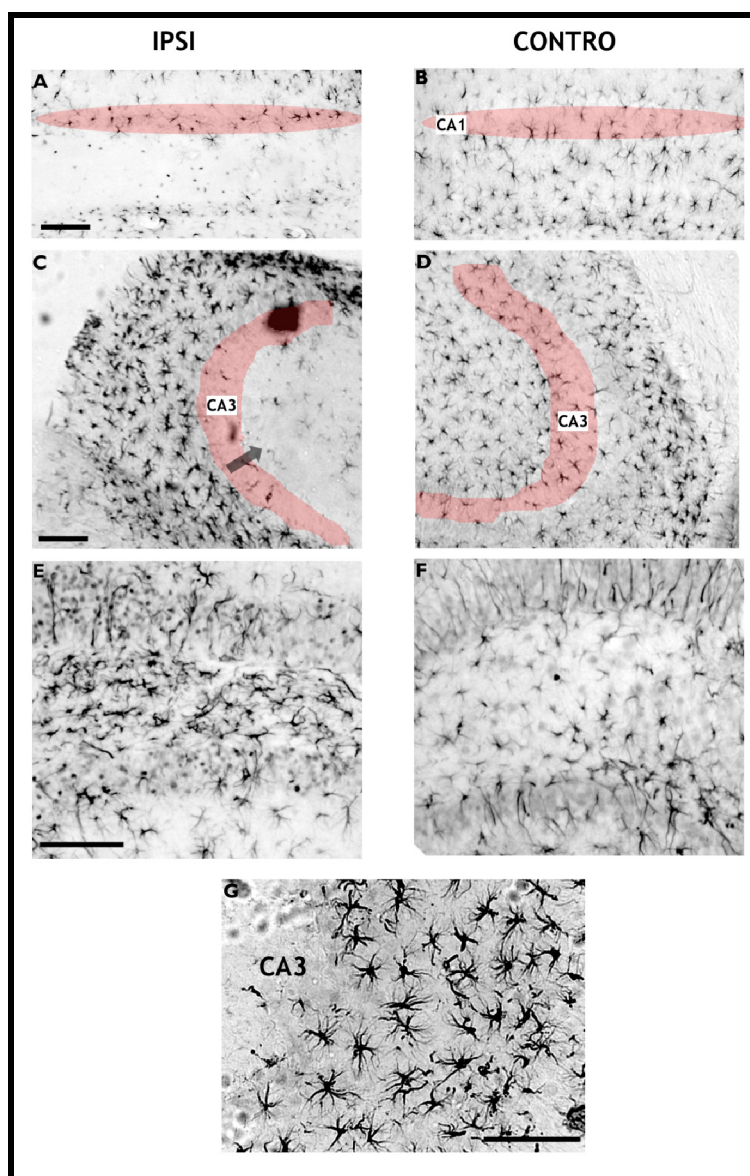
(A), douze heures après l'injection intrahippocampique de KA (n=2), le marquage argentique a révélé des neurones dégénérants dans la couche CA1, CA3 et dans le hile de l'hippocampe ipsilatéral (grains noirs, flèches blanches). Ces événements neurodégénératifs ont semblé plus intenses 48 h post-injection (n=2, B). Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

### ***b.Activation cellulaire***

Des cellules Fos-positives intensément marquées ont été détectées 12 h après l'induction du SE dans les couches pyramidales de CA1 et de CA3, et au niveau des cellules moussues du hile ainsi qu'au niveau des cellules granulaires du bras supérieur du GD dans l'hippocampe ipsilatéral (n=2, données non illustrées). Ces mêmes zones comportaient des cellules plus faiblement marquées dans l'hippocampe controlatéral (n=2). Deux jours après l'injection de KA, très peu de cellules Fos-positives étaient encore présentes dans les zones initialement activées de l'hippocampe (n=2, données non illustrées). En revanche, à ce temps d'étude, des cellules Fos-positives ont été détectées dans les champs dendritiques de CA1 et CA3 et dans la zone sous-granulaire du GD, à fois dans l'hippocampe ipsilatéral et controlatéral (n=2, Figure 36). La forme étoilée de ces cellules suggère qu'elles puissent être des astrocytes (Figure 36G). Comme dans le cas de la réaction astrocytaire révélée par le marquage immunohistochimique GFAP (voir page 120 et Figure 34), ces cellules Fos-positives étaient peu présentes dans les zones neurodégénérantes de l'hippocampe ipsilatéral (n=2, Figure 36A, C). Ces cellules étaient au contraire bien visibles au niveau de

l'hippocampe controlatéral (n=2, Figure 36B, D). De façon intéressante, une situation inverse a été observée dans la couche sous-granulaire du GD où ces cellules Fos-positives étaient présentes en plus grand nombre du côté ipsilatéral (n=2, Figure 36E, F).

**Figure 36. Expression retardée de la protéine Fos dans des cellules de morphologie évoquant celle des astrocytes**



Des cellules ayant une morphologie astrocytaire expriment Fos dans l'hippocampe ipsilatéral et controlatéral 48 h après l'injection intrahippocampique de KA (n=2). Le nombre de cellules Fos-positives était faible à proximité des zones neurodégénérantes de l'hippocampe ipsilatéral comme CA1 (A) et CA3 (C, voir flèche). (B, D), les cellules Fos-positives, absentes des souris TEM (données non illustrées), avaient une distribution homogène au sein de l'hippocampe controlatéral. (E, F), inversement, dans le hile, les cellules Fos-positives semblaient plus nombreuses dans l'hippocampe ipsilatéral par rapport à l'hippocampe controlatéral. (G), la forme étoilée des cellules exprimant Fos 48 h après l'injection de KA suggère qu'elles puissent être des astrocytes. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ .



### **III.3. Effets de la modulation inflammatoire sur le processus d'épileptogénèse**

#### ***III.3.1. Activation neuro-inflammatoire induite par le LPS***

Une vingtaine de minutes après l'injection de LPS (0,8 mg/kg, ip), un comportement caractérisé par un hérissément des poils associé à une prostration a été mis en évidence (LPS/KA et LPS/TEM, n=14). Un contrôle histologique a indiqué que le traitement LPS à cette dose n'induisait pas par lui-même de processus neurodégénératif dans la structure hippocampique de la souris 14 j après l'injection (LPS/TEM, n=5 ; Figure 38).

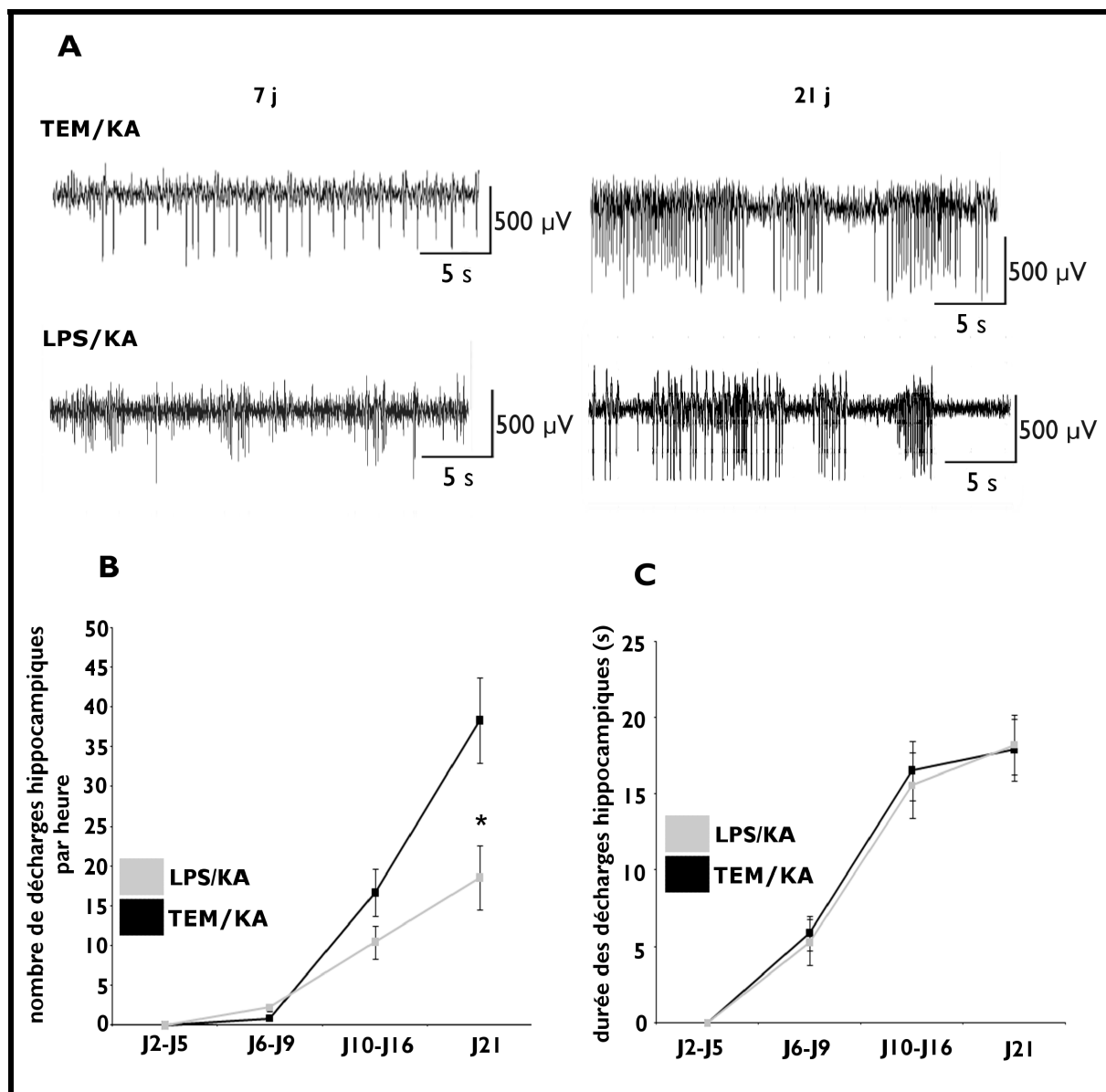
#### ***a. Étude électro-encéphalographique***

La micro-injection intrahippocampique de KA a provoqué le comportement caractéristique associé au SE chez les animaux du groupe TEM/KA (n=9, voir Résultats, page 117) ; en revanche, les animaux prétraités avec le LPS avaient une expression clinique caractérisée par des mouvements cloniques plus lents et de longues phases d'immobilité (LPS/KA, n=9).

Les animaux du groupe TEM n'ont pas montré d'événements paroxystiques durant la période d'observation (21 j, n=4). De même, aucune décharge hippocampique n'a été observée chez les animaux des groupes TEM/KA (n=4) et LPS/KA (n=4) durant les périodes 2-5 j et 6-9 j après l'injection intrahippocampique de KA. Les premières décharges ont été détectées 10-16 j post-injection avec des fréquences de ~1,4 décharges par heure dans le groupe TEM/KA et de ~2,1 décharges par heure dans le groupe LPS/KA. Lors de la dernière session d'enregistrement EEG 21 j après l'induction du SE par le KA, les décharges hippocampiques étaient plus fréquentes chez les animaux du groupe TEM/KA (~7,6 décharges par heure, n=4) par rapport aux animaux du groupe LPS/KA (~2,5 décharges par heure, n=4). Cette différence entre les deux groupes est significative ( $p < 0,05$ ). En

revanche, la durée moyenne des décharges hippocampiques était équivalente dans les deux groupes pour atteindre ~19 s, 21 j après l'injection de KA (Figure 37C).

**Figure 37. Effet de l'activation neuro-inflammatoire par le lipopolysaccharide sur la cinétique de l'épileptogénèse induite par la micro-injection intrahippocampique de KA**



(A), tracés EEG représentatifs du développement de l'activité épileptique induite par la micro-injection intrahippocampique de KA chez les animaux prétraités avec du sérum physiologique (TEM/KA, 300  $\mu$ l ; n=4) ou avec du LPS (LPS/KA ; 0,8 mg/kg, ip ; n=4), 7 et 21 j après l'induction de l'épileptogénèse au sein de l'hippocampe ipsilatéral (KA, 1 nmol). (B), les animaux du groupe LPS/KA (n=4) ont présenté des décharges moins fréquentes 21 j après l'injection par rapport aux animaux du groupe TEM/KA (n=4). (C), en revanche, la durée des décharges était équivalente dans les deux conditions au cours du développement de la maladie épileptique. Les données sont indiquées par la moyenne  $\pm$  ES. \*,  $p < 0,05$ .

### ***b. Analyse histologique***

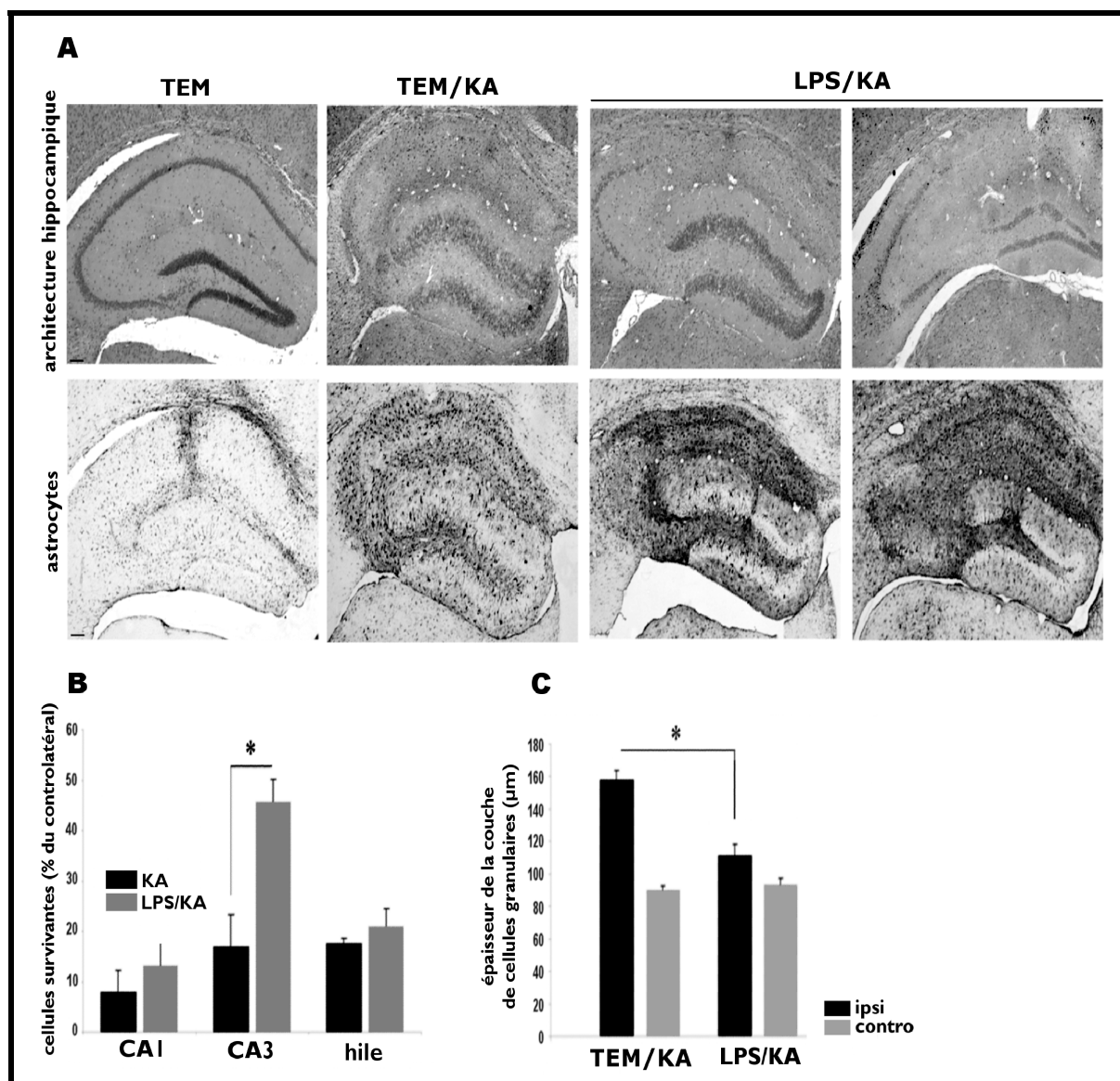
Le nombre de cellules survivantes a été estimé dans les régions CA1, CA3 et du hile de l'hippocampe ipsilatéral. Le prétraitement à base de LPS réduit la perte neuronale induite par le KA seulement dans la région CA3 (~45 % de cellules survivantes dans le groupe LPS/KA au lieu de ~18 % dans le groupe TEM/KA, n=4 par groupe;  $p < 0,05$  ; Figure 38).

L'évaluation quantitative de l'élargissement de la couche granulaire du GD montre une diminution de la dispersion par le LPS 21 j après l'induction du SE par le KA (~154  $\mu\text{m}$  au lieu de ~182  $\mu\text{m}$ , pour les animaux LPS/KA et TEM/KA, respectivement, n=4 par groupe ;  $p < 0,05$  ; Figure 38).

Les animaux du groupe LPS/KA ont montré une réactivité astrogliale supérieure aux animaux du groupe TEM/KA au sein de l'hippocampe ipsilatéral 21 j après l'injection de KA (Figure 38).

Ces mêmes événements ont été constatés également 14 j après l'induction du SE par le KA (TEM/KA, n=5 ; LPS/KA, n=5, données non illustrées).

**Figure 38. Effets de l'activation neuro-inflammatoire par le prétraitement LPS sur les conséquences histopathologiques de la micro-injection intrahippocampique de KA**



Après analyse EEG et détection de décharges hippocampiques récurrentes (voir Figure 37), les souris ont été analysées 21 j post-injection, par un marquage H&P et un immunomarquage GFAP. (A), chez les animaux du groupe LPS/KA, l'étendue de la neurodégénérescence varie parmi les animaux (n=4), et une neuroprotection modérée et maximale est illustrée dans cette figure (en haut à droite). La réaction astrocytaire est plus soutenue 21 j post-injection chez les animaux du groupe LPS/KA que chez les animaux du groupe TEM/KA (n=4). (B), le nombre de cellules saines dans les couches CA1, CA3 ainsi que dans le hile de l'hippocampe ipsilatéral a été analysé comme indiqué Section C, page 198. Significativement plus de neurones sains ont été détectés dans la couche CA3 des animaux du groupe LPS/KA par rapport aux animaux du groupe TEM/KA, 21 j après l'injection. (C), la dispersion des cellules granulaires du gyrus denté est également moins prononcée chez les animaux LPS/KA. Les résultats sont indiqués par la moyenne  $\pm$  ES. \*,  $p < 0,05$ . Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

### ***III.3.2. Inhibition de la voie de la cyclo-oxygénase-2***

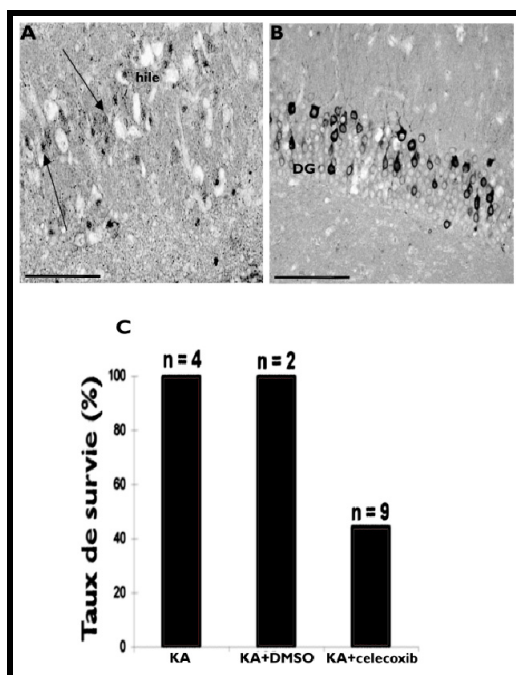
#### ***a. Mise en évidence de l'induction de COX-2***

Aucune cellule COX-2-positive n'a été observée chez l'animal TEM (3j, n=1) ni dans l'hippocampe controlatéral des animaux KA (48 h, n=2 ; 3 j, n=1). Le marquage immunohistochimique a démontré un marquage spécifique à 48 h (n=2) et jusqu'à 3 j (n=1) après l'injection intrahippocampique de KA, principalement dans les secteurs CA1, CA3 et le bras supérieur du GD de l'hippocampe ipsilatéral (Figure 39).

#### ***b. Conséquences de l'injection de celecoxib***

Sur les neuf animaux du groupe KA/coxib, cinq sont décédés consécutivement à l'injection du celecoxib avec une exacerbation des signes moteurs. Aucun décès n'a été constaté lorsque le solvant du celecoxib a été administré (KA/DMSO, n=4).

Sur le plan EEG, aucune différence dans le développement du processus d'épileptogénèse n'a été constatée chez l'animal KA/coxib survivant durant les 21 j d'étude par rapport aux animaux du groupe TEM/KA. De même, l'analyse histologique n'a révélé aucune différence notable ni dans les pertes cellulaires ni dans la réactivité astrogliale chez cet animal comparé aux animaux du groupe TEM/KA (n=4) 21 j après l'induction du SE par le KA. Chez les animaux KA/coxib survivants (n=3) et euthanasiés 14 j après l'injection, aucune différence sur la survie neuronale n'a été observée à l'aide du marquage H&P par rapport aux animaux du groupe KA/DMSO (n=6, données non illustrées).



**Figure 39. Induction de la protéine COX-2 suite à l'injection intrahippocampique de KA chez la souris et impact de son inhibition par le celecoxib sur la survie des animaux**

Photomicrographies de l'immunomarquage COX-2 dans le hilus (A) et au niveau des cellules granulaires du GD (B) de l'hippocampe ipsilatéral de souris 3 j après la micro-injection de KA. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. La micro-injection intrahippocampique de KA associée ou non avec une injection ip de diméthylsulfoxyde (DMSO, 300  $\mu$ l), le solvant du celecoxib, n'a pas induit de mortalité chez les souris (C, n=4 et n=2, respectivement). En revanche, l'injection de celecoxib (10 mg/kg ip, n=9) 2 h après la micro-injection de KA a induit une surmortalité des animaux (5/9) durant le SE.

### III.4. Quantification de l'ARNm des marqueurs inflammatoires au cours de l'épileptogénèse

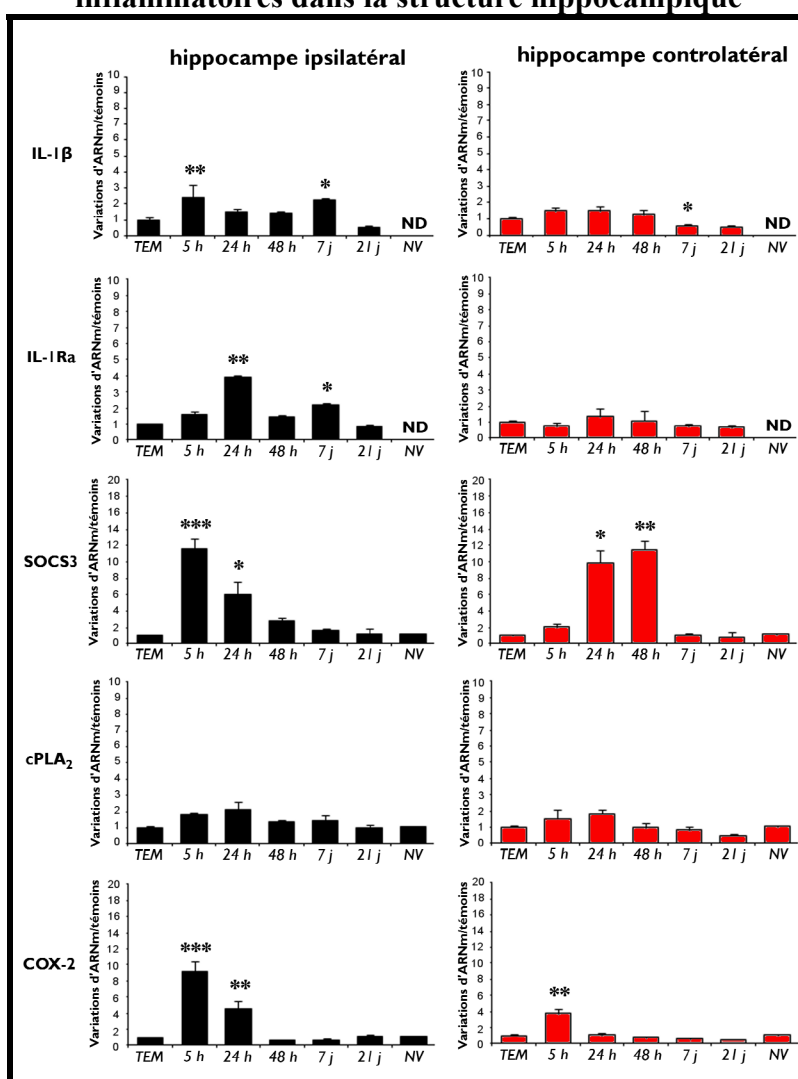
#### III.4.1. Structure hippocampique

Le SE induit par le KA entraîne une augmentation de la quantité des ARNm étudiés dans l'hippocampe ipsilatéral (Figure 40). Dans notre étude, le pic se situe à 5 h pour l'IL-1 $\beta$  (x2,4) et la quantité d'ARNm retourne à son taux de base 2 j après le SE. La quantité d'ARNm d'IL-1Ra augmente plus tard, avec un pic 24 h après l'induction du SE (x3,9). Le retour au niveau de base se situe 48 h post-injection. Pour ces ARNm de la famille IL-1, un second pic est noté 7 j après l'induction du SE (x2,2) avec un retour au niveau basal à 21 j, en fin probable d'épileptogénèse, quand les décharges deviennent récurrentes. L'augmentation de la quantité d'ARNm de SOCS3 est maximale dès 5 h après la mise en place du SE (x11,7), reste élevée à 24 h (x6,0) et retourne au niveau basal à 48 h. Le pic de l'augmentation de la quantité d'ARNm de COX-2 est détecté dès 5 h (x9,1) après la mise en place du SE avec un

taux qui reste élevée à 24 h (x4,5) et un retour au niveau basal dès 48 h après l'injection de KA. La quantité d'ARNm de cPLA<sub>2</sub> n'a pas été significativement altérée au cours du SE induit par le KA.

Dans l'hippocampe controlatéral, nous avons détecté une augmentation significative des quantités d'ARNm codant pour COX-2 à 5 h (x3,8) et SOCS3 à 24 et 48 h (~x10) après l'injection.

**Figure 40. Variations temporelles de l'expression ARNm de marqueurs pro-inflammatoires dans la structure hippocampique**



L'analyse RT-qPCR de marqueurs neuro-inflammatoires a été effectuée sur des extraits d'ARN totaux d'hippocampes ipsi- et controlatéraux issus d'animaux injectés unilatéralement dans l'hippocampe avec du sérum physiologique (50 nL, TEM) ou du KA à 5 h, 1, 2, 7 et 21 j. (n=5-11 par groupe). L'hippocampe d'animaux naïfs (NV) a également été prélevé (n=6). Les variations d'ARNm (voir Section C, page 199) ont été calculées par rapport au groupe TEM pour chaque marqueur. \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,005. Les valeurs sont indiquées par la moyenne ± ES.

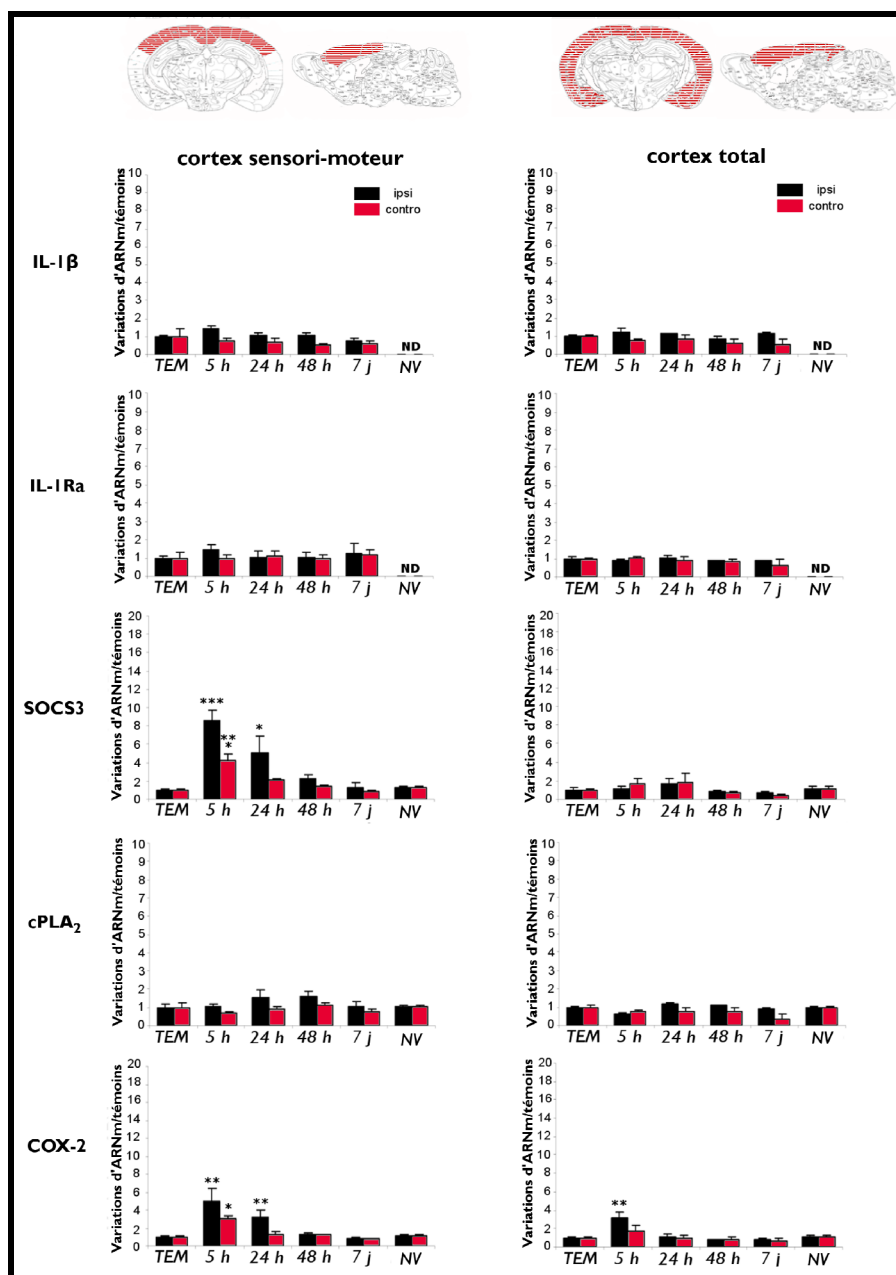
### *III.4.2.Structures extrahippocampiques*

Une augmentation significative des quantités d'ARNm de SOCS3 et de COX-2 à 5 h (x8,6 et x7,8, respectivement) ainsi qu'à 24 h (x5,1 et x4,2, respectivement) post-injection a été observée dans le néocortex sensori-moteur ipsilatéral par rapport à la même structure des animaux du groupe TEM (Figure 41, gauche). Comme dans l'hippocampe, il est intéressant de noter une augmentation significative des quantités d'ARNm de COX-2 et de SOCS3 du côté controlatéral, avec une cinétique différente toutefois (~x4 à 5 h de l'injection).

Dans le néocortex total, une augmentation transitoire de l'ARNm de COX-2 a été observée dans la structure ipsilatérale 5 h après la mise en place du SE (x3,2 ; Figure 41, droite).



**Figure 41. Variations temporelles de l'expression ARNm de marqueurs pro-inflammatoires dans des structures extrahippocampiques**



L'analyse RT-qPCR de marqueurs neuro-inflammatoires a été effectuée sur des extraits d'ARN totaux de cortex sensori-moteur (partie gauche) ou de néocortex total (partie droite). Des animaux naïfs (NV) ou micro-injectés avec du sérum physiologique (50 nL, TEM) ou du KA à 5 h, 1, 2 et 7 j ont été analysés et la différence a été calculée par rapport au groupe TEM pour chaque marqueur (voir Section C, page 199). \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; ND, non détecté. Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  ES.

## IV. Éléments de discussion

### Événements cellulaires associées à l'épileptogenèse

Deux à 3 j après l'injection de KA, les événements précoces de l'épileptogenèse sont caractérisés par des modifications neurodégénératives accompagnées par une activation puissante des cellules microgliales et astrocytaires dans l'hippocampe ipsilatéral. Notamment, des cellules microgliales, à un stade élevé d'activation, ont pu être détectées dans l'environnement immédiat des neurones dégénéralents. Le même profil spatio-temporel est également décrit dans des modèles différents de crises récurrentes chez l'animal (Borges et coll., 2003; Shapiro et coll., 2008). Malgré l'induction d'un SE caractérisé par des décharges hippocampiques bilatérales (Riban et coll., 2002), seul l'hippocampe ipsilatéral présente une activation intense des cellules microgliales dans ce modèle d'EMLT. Ces données sont en faveur d'un rôle majeur de l'excitotoxicité associée au KA dans l'initiation et l'intensité de la réponse neuro-inflammatoire dans cette structure.

Nous avons été surpris de ne pas avoir détecté de cellules microgliales durant les phases plus lointaines (à partir de 7 j après l'injection de KA) de l'épileptogenèse. Il est possible qu'il y ait une cause méthodologique liée à l'utilisation de la lectine car dans ce même modèle d'épilepsie, des cellules microgliales activées ont été détectées par d'autres auteurs (Heinrich et coll., 2006), 7 j après l'injection en utilisant une détection immunohistochimique d'Iba1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*). Des modifications influençant l'accessibilité et la réactivité de la lectine comme par exemple des variations du micro-environnement extracellulaire hippocampique durant le processus d'épileptogenèse (Navarro, 2007 ; Takahashi et coll., 2008) pourraient être impliquées.

Dans l'hippocampe ipsilatéral, la réactivité astrocytaire est clairement retardée dans les zones de neurodégénérescence où elle ne devient visible qu'après 7 j dans nos conditions

expérimentales. Il est possible que l'absence d'astrocytes dans les zones de dégénérescence soit liée à leur mort. Ce phénomène a déjà été mis en évidence dans un modèle de crises induites par la pilocarpine chez la souris (Borges et coll., 2006). Cette mort astrocytaire pourrait avoir des conséquences sur la viabilité des neurones compte tenu des divers rôles potentiellement bénéfiques des astrocytes (Barres et Barde, 2000).

Nous avons constaté de nombreuses cellules Fos-positives, avec une forme évoquant celle des astrocytes, dans la zone neurogénique sous-granulaire de l'hippocampe ipsilatéral 48 h après l'injection de KA chez la souris. Le nombre de progéniteurs est également augmenté dans l'hippocampe de patients atteints d'EPLT (Crespel et coll., 2005) et la présence probable d'astrocytes immatures (voir page 22) pourrait avoir des conséquences épileptogènes. En effet, l'altération de leurs propriétés (Hinterkeuser et coll., 2000) pourrait intervenir dans l'hyperexcitabilité de la structure hippocampique (Kang et coll., 2006).

Après l'induction de crises épileptiques, l'expression neuronale de Fos apparaît dans de multiples régions cérébrales de la souris, alors que l'induction de cette protéine dans les cellules astrocytaires n'a pas été initialement mise en évidence (Morgan et coll., 1987). Les astrocytes, par l'induction de ce gène d'induction rapide, répondent aux facteurs hormonaux (Arenander et de Vellis, 1992), aux dommages cérébraux (Dragunow et coll., 1990) et récemment au glutamate (Edling et coll., 2007). Nos résultats préliminaires indiquent une réponse astrocytaire retardée (48 h). Cette réponse n'existe pas chez les témoins, mais est révélée chez les animaux traités avec le KA à la fois dans l'hippocampe ipsi- et controlatéral. Ce résultat pourrait être lié au SE induit par le KA dont on sait qu'il se propage de façon bilatérale au sein de l'hippocampe après injection unilatérale de KA (Riban et coll., 2002).

### **Effet du lipopolysaccharide**

Parmi les signaux majeurs qui gouvernent l'activation gliale, la réponse inflammatoire induite par le LPS est caractérisée par la synthèse de cytokines au sein du SNC qui stimulent l'activation astrocytaire (Laye et coll., 1994 ; Nguyen et coll., 1998 ; Verma et coll., 2006). Nos résultats expérimentaux révèlent que le prétraitement avec le LPS avant l'induction du SE est efficace pour diminuer la perte neuronale dans la couche CA3 ainsi que la cinétique de l'épileptogénèse, sans pour autant affecter les caractéristiques des décharges paroxystiques hippocampiques dans ce modèle d'EMLT. Notre méthodologie ne nous permet pas de déterminer les mécanismes responsables de ces effets du LPS, mais il est possible qu'ils soient reliés à un mécanisme de préconditionnement. Le préconditionnement décrit un phénomène selon lequel un stimulus à une dose inférieure au seuil de toxicité tissulaire produit une protection, ou une tolérance, aux effets toxiques d'un stimulus plus sévère. Le LPS est un déclencheur reconnu du phénomène de préconditionnement (Shpargel et coll., 2008). Administré en périphérie, le LPS induit une protection contre de nombreux traumatismes, dont l'ischémie cérébrale (Stenzel-Poore et coll., 2007), l'activation des composants de la réponse immunitaire adaptative (Rosenzweig et coll., 2007) et récemment les dommages excitotoxiques induits par la pilocarpine (Dmowska et coll., 2009).

Dans notre étude, l'effet neuroprotecteur du LPS est associé sur le plan histologique à une astroglie massive au sein de l'hippocampe ipsilatéral. Des études complémentaires doivent être imaginées afin de déterminer si cette réactivité astrocytaire à l'injection du LPS, amplifiée par le KA, joue un rôle dans les effets bénéfiques du prétraitement par le LPS. D'autres études doivent également être menées pour vérifier que l'effet du LPS sur le développement des décharges à long terme et la neurodégénérescence, ne soit pas lié en fait à une modulation de l'intensité du SE induit par le KA. En effet, nous avons noté un état caractéristique quelques minutes après l'administration ip de cette forte dose de LPS comme

décrit couramment (Dantzer et coll., 1998), incluant notamment une réduction de la locomotion et une piloérection, traduisant un effet pathophysiologique important et susceptible d'interférer avec le développement des crises initiales.

### **Effets du celecoxib**

Après l'injection de KA, dans une expérimentation préliminaire destinée à confirmer la présence de la cible du celecoxib, nous avons détecté une induction de la synthèse de COX-2 dans l'hippocampe ipsilatéral des souris. Malgré sa participation dans la physiologie du SNC, il a été suggéré que COX-2 joue également un rôle dans certains désordres neurologiques, dont l'épilepsie (Tu et Bazan, 2003). L'induction de COX-2 reflétant également l'activation neuronale et sa propagation (Joseph et coll., 2006), cela pourrait expliquer l'absence d'induction de cette protéine dans l'hippocampe controlatéral à distance du site d'initiation du SE dans notre expérimentation.

L'étude du rôle de COX-2 dans la genèse et la maintenance des états convulsifs aboutit à des études contradictoires. L'inhibition pharmacologique à l'aide de coxibs a montré une augmentation (Baik et coll., 1999 ; Kim et coll., 2008) ou une diminution (Kawaguchi et coll., 2005) de l'excitotoxicité dans les crises induites chimiquement chez le rongeur. Nous avons pu constater que l'administration de celecoxib durant le SE a exacerbé les conséquences motrices du SE induit par l'injection intrahippocampique de KA et pouvait aboutir au décès des animaux. Ces résultats sont en accord avec d'autres études utilisant l'injection systémique de KA pour initier les crises (Kim et coll., 2008) ou menées chez des souris déficientes en COX-2 (Toscano et coll., 2008). Dans nos conditions expérimentales, et en particulier lorsque le celecoxib est administré rapidement (2 h) après le début du SE, l'inhibition de COX-2 est donc apparemment délétère suggérant un rôle protecteur de certains eicosanoïdes normalement produits durant cette période de temps.

## Les médiateurs moléculaires de la neuro-inflammation

Conformément à des études précédentes, nos résultats démontrent une augmentation précoce des quantités d'ARNm de l'IL-1 $\beta$  et de COX-2, et une augmentation retardée de celles de l'IL-1Ra (de Simoni et coll., 2000 ; Vezzani et coll., 1999). Nous avons également démontré une augmentation importante de l'ARNm de SOCS3 qui a une cinétique différente au sein de l'hippocampe ipsi- et controlatéral.

Les variations constatées pour l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  sont spécifiques de l'hippocampe ipsilatéral et précèdent la neurodégénérescence ainsi que la perte neuronale. La mise en évidence de la protéine IL-1 $\beta$  s'étant heurtée à des problèmes techniques, nous n'avons pas pu malheureusement compléter ce résultat par l'analyse de la localisation de la protéine. L'IL-1 $\beta$  pourrait être en effet un acteur précoce contribuant à la dégénérescence des neurones et/ou au processus d'épileptogenèse selon des modalités restant à déterminer (Vezzani et Baram, 2007; Vezzani et coll., 2000). Il a été par exemple démontré que la résistance des neurones au SE induit par la bicuculline est lié à la faible production d'IL-1 $\beta$  tissulaire (Vezzani et coll., 1999). Pour pallier à la toxicité d'IL-1 $\beta$ , le tissu répond par l'induction d'ARNm d'IL-1Ra, antagoniste naturel du récepteur IL-1RI. Cette cytokine anti-inflammatoire possède des propriétés neuroprotectrices. Nous avons constaté une augmentation différée de l'ARNm de l'IL-1Ra comme déjà montré dans d'autres modèles (de Simoni et coll., 2000). L'induction serait alors trop tardive pour contrecarrer les effets délétères d'IL-1 $\beta$ .

L'ARNm de SOCS3 est très faiblement exprimé chez les animaux témoins, mais l'intensité et la distribution spatio-temporelle de l'expression ARNm de cette cytokine sont altérées profondément par la micro-injection de KA. SOCS3 est impliquée comme modulateur négatif du signal cytokinique produit par l'IL-6, une cytokine qui induit la synthèse de l'ARNm de SOCS3 (Crocker et coll., 2003 ; Fujimoto et Naka, 2003 ; Lang et

coll., 2003). La résistance à la neurodégénérescence dans l'hippocampe controlatéral, malgré la présence de décharges hippocampiques initiales durant le SE, pourrait en partie être due à la réponse transcriptionnelle soutenue de SOCS3 qui se produit dans cette structure.

## **Étude III**

**Stabilité de gènes référents potentiels pour la  
normalisation des données de RT-qPCR  
dans le modèle de micro-injection  
intrahippocampique de kainate chez la  
souris**



## **I. Introduction et objectifs**

La technique RT-qPCR est actuellement une procédure de référence pour l'étude des altérations d'expression génique, à condition qu'une stratégie de normalisation des données soit utilisée (Bustin et coll., 2009). La normalisation des données est requise pour contrôler les erreurs expérimentales introduites durant les étapes pré-analytiques (Huggett et coll., 2005). Plusieurs stratégies de normalisation ont été proposées, mais la méthode la plus utilisée est actuellement l'utilisation de gènes de référence. De façon surprenante, la plupart des études de neurobiologie utilisent la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Gapdh), l'actine  $\beta$  (Actb) ou l'ARN ribosomal 18S (18S) comme gènes de référence dans le cerveau, sans protocole de validation préliminaire. Or, ce fait pourrait amener des biais importants et induire un doute sérieux sur la validité des résultats puisque certaines études ont démontré des variations physiologiques ou pathophysiologiques du niveau d'ARNm de ces gènes de référence « classiques » (Dheda et coll., 2004 ; Gilsbach et coll., 2006 ; Goidin et coll., 2001 ; Schmittgen et Zakrajsek, 2000).

Différentes solutions existent pour déterminer la stabilité requise pour une normalisation adéquate, comme les logiciels geNorm (Vandesompele et coll., 2002) et NormFinder (Andersen et coll., 2004), tous deux accessibles gratuitement. Leur utilisation permet de vérifier les variations de stabilité des gènes référents induites par diverses conditions expérimentales et dépendantes des structures cérébrales analysées (Cook et coll., 2009 ; Derks et coll., 2008 ; Santos et Duarte, 2008).

L'EMLT est la plus courante des épilepsies focales et l'amélioration des options thérapeutiques requiert une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'émergence des crises, à la fois au niveau cellulaire et moléculaire. La détermination des niveaux d'ARNm de certains gènes cibles peut jouer un rôle central dans la compréhension

des processus aboutissant aux atteintes histologiques majeures et aux crises récurrentes focales de l'EMLT. En raison de l'absence d'études similaires dans le domaine de l'épilepsie, et afin de s'assurer de résultats fiables lors de l'analyse des données de RT-qPCR, la présente étude a été initiée afin de définir des gènes de référence appropriés, exprimés de façon stable, durant les différentes périodes de la maladie épileptique.

### Objectifs

**Évaluer la stabilité de gènes de références potentiels durant le processus d'épileptogenèse dans un modèle murin d'épilepsie méso-temporale**

## II. Protocoles d'étude

### II.1. Groupes expérimentaux

Nous avons choisi, pour cette expérimentation méthodologique, d'utiliser la micro-injection intrahippocampique de KA chez la souris afin de reproduire les principales caractéristiques de l'EMLT (Section A, page 18). Les gènes de référence potentiels choisis pour cette étude ont été sélectionnés parmi les plus utilisés dans la littérature : *Gapdh*, *18S*, *Actb* et l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 (*Hprt1*) et parmi des gènes appartenant à des classes fonctionnelles distinctes pour empêcher les processus de corégulation (phosphoprotéine ribosomale acide A, *Arbp*; *TATA box binding protein*, *Tbp*; peptidylpropyl isomérase A, *Ppia* et glucuronidase  $\beta$ , *Gusb*). La stabilité de ces différents gènes a été analysée à l'aide de deux outils disponibles, *geNorm* (Vandesompele et coll., 2002) et *NormFinder* (Andersen et coll., 2004).

Nous avons ainsi évalué huit gènes de référence potentiels durant le SE (5 h, n=6), la phase d'épileptogenèse (7 j, n=6) et la période chronique de récurrence des décharges hippocampiques ipsilatérales (21 j, n=6) après l'injection intrahippocampique unilatérale de

KA, à la fois dans l'hippocampe injecté et la structure controlatérale. Des souris naïves ont été étudiées de la même façon (NV, n=6).

Les animaux ont été sacrifiés par décapitation. Les cerveaux ont été rapidement récupérés et la structures hippocampique ipsi- et controlatérale, a été microdisséquée dans un environnement adapté dépourvu d'ARN et de RNases. Les différents échantillons ont ensuite été traités comme indiqué à partir de la page 179 de la Section C.

Afin de contrôler l'intégrité des ARNm extraits et le rendement de la RT, un essai d'intégrité 3':5' (Bustin et coll., 2009) a été effectué avec les amorces F1-R1 et F2-R2 de Gapdh (Tableau 6). Le rapport des cycles de quantification (Cq) des deux essais pour l'ensemble des échantillons était de  $0,91 \pm 0,03$  (moyenne  $\pm$  ES ; n=42). Le ratio théorique de 0,98 a été calculé à partir de l'ADN recombinant spécifique (voir page 179).

## **II.2. Validation des gènes de référence**

Pour étudier l'expression des gènes de référence potentiels et valider les plus stables en tant qu'étalons internes, les données de RT-qPCR ont été analysées en utilisant deux stratégies. Premièrement, la quantité relative (page 183) de chaque échantillon a été exportée, pour chaque gène testé, vers le logiciel geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Cet algorithme permet d'évaluer les gènes et de les classer suivant leur stabilité. Une des données fournies par le logiciel est l'expression moyenne de stabilité, définie par la valeur  $M$ . Les transcrits possédant la plus faible valeur de  $M$  ont l'expression la plus stable. Une autre donnée fournie par le logiciel est basée sur une analyse de la variation induite par l'ajout de gène,  $V$ , qui permet d'en déduire le nombre optimal de gènes de référence nécessaires à une normalisation satisfaisante dans les conditions expérimentales. La valeur seuil pour  $V$  a été définie à 0,15 par les auteurs de l'algorithme geNorm (Vandesompele et coll., 2002) : une valeur de  $V$  en dessous de ce seuil

signifie que l'inclusion d'un gène supplémentaire n'améliore pas significativement la normalisation (Vandesompele et coll., 2002).

Deuxièmement, pour valider l'analyse geNorm, les données brutes ont été exportées dans un logiciel alternatif (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>), qui fournit une valeur de stabilité (mais non comparable à la valeur  $M$  de geNorm) pour chaque gène indépendamment, permettant leur classement (Tableau 4).

### **II.3. Analyse d'un gène cible**

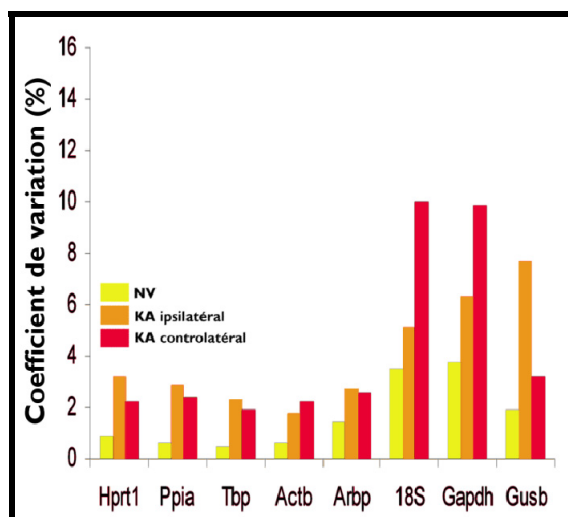
Afin d'étudier l'importance de la stratégie de normalisation dans l'expression des résultats de RT-qPCR, nous avons choisi d'étudier l'expression ARNm d'un gène cible. En raison de la forte activation astrocytaire observée dans le modèle utilisé (voir page 120), nous avons choisi d'étudier l'expression ARNm de Gfap au cours de l'évolution de la maladie épileptique dans ce modèle, ainsi que l'impact des différentes stratégies de normalisation sur les résultats obtenus.

## **III. Résultats**

### **III.1. Stabilité des gènes de référence pendant l'évolution de la maladie épileptique**

L'analyse révèle un niveau d'expression qui varie entre 13,8 et 29,6 cycles (pour 18S et Gusb, respectivement). Une analyse statistique descriptive a été initiée afin de déterminer les niveaux de variation de chacun des gènes étudiés. Nous avons tout d'abord comparé la déviation standard (DS) des valeurs du Cq ( $n = 42$ ) pour chacun des gènes dans l'hippocampe de chacune des souris. En nous basant sur la DS, un premier groupe de gènes faiblement variables a été déterminé : Ppia < Actb < Hprt1 < Tbp < Arbp. Une DS plus importante a été calculée pour les trois autres gènes : 18s < Gusb  $\cong$  Gapdh. Le coefficient de variation (CV, %)

pour ces trois gènes était au-dessus de 6,6% (non illustré). Lorsque le CV a été déterminé en fonction des trois structures différentes (hippocampe ipsi et controlatéral des animaux KA et hippocampe des souris NV), trois schémas ont été mis en évidence (Figure 42) : (i) le groupe de cinq gènes déjà mentionnés (Ppia, Actb, Hprt1, Tbp et Arbp) qui ont montré des expressions stables, avec des CV compris entre 2,1 et 3,4% ; (ii) 18S et Gapdh, dont l'expression ARNm est hautement variable, notamment dans l'hippocampe controlatéral des animaux du groupe KA et enfin (iii) Gusb dont l'expression ARNm était plus variable dans l'hippocampe ipsilatéral des animaux du groupe KA que dans l'hippocampe controlatéral (CV de 7,9% et 3,2%, respectivement).



**Figure 42. Variations du cycle de quantification (Cq) des gènes de référence étudiés et exprimés en coefficient de variation**

La distribution des valeurs de Cq pour les huit gènes de référence dans l'hippocampe ipsi- et controlatéral durant l'évolution du processus épileptique (5 h, 7 et 21 j post-injection ; n=6 par temps) ainsi que dans l'hippocampe de souris naïves (NV, n=6) est présentée. Les valeurs de Cq pour 18S, Gapdh et Gusb sont très variables chez les animaux du groupe KA. Les valeurs de Cq pour Gusb sont relativement stables dans l'hippocampe controlatéral des animaux du groupe KA par rapport à l'hippocampe ipsilatéral (CV=3,2% contre 7,9%).

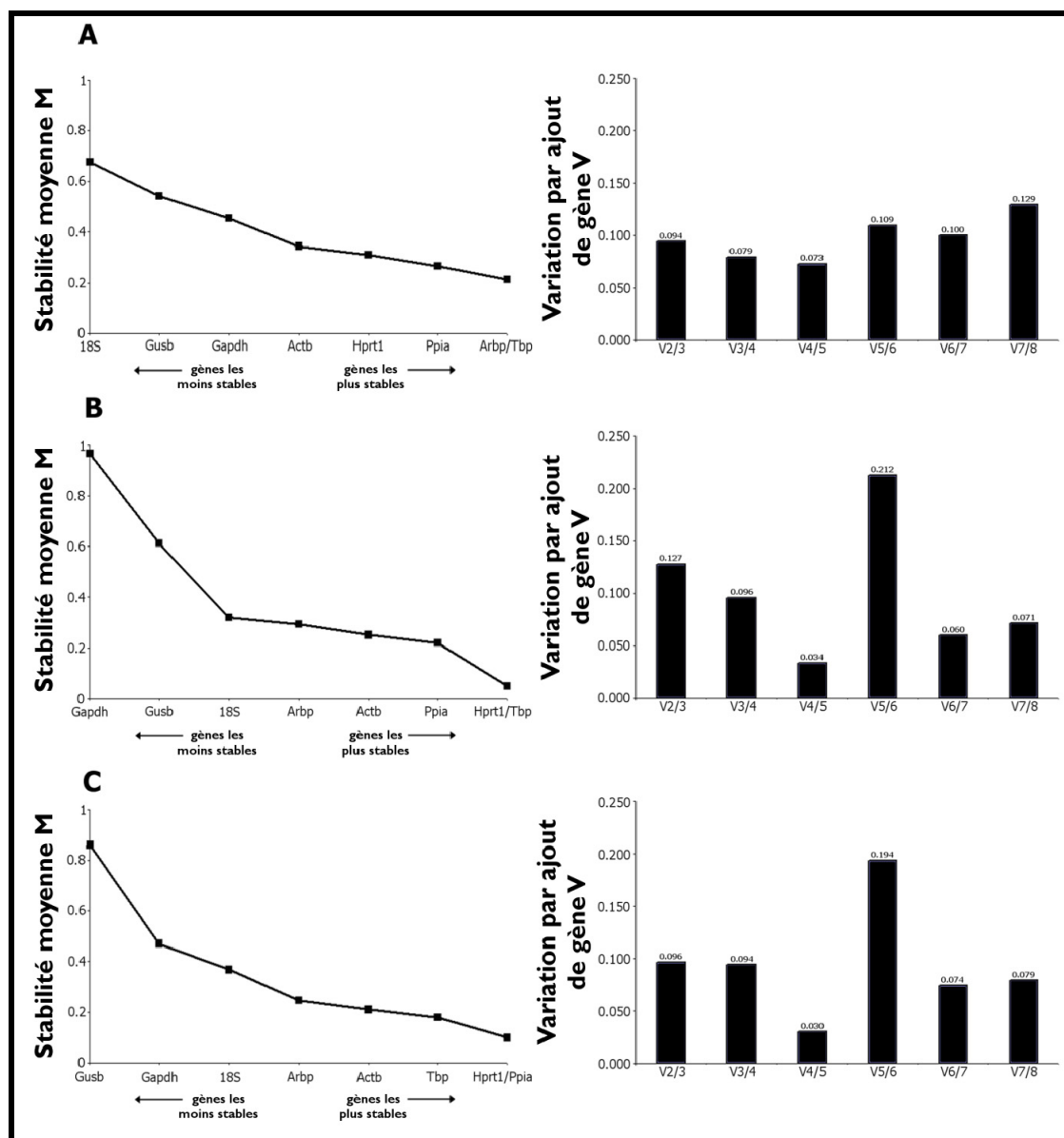
## **III.2. Validation des gènes de référence**

### ***III.2.1. Analyse geNorm***

La stabilité des gènes de référence potentiels a été déterminée en premier lieu dans l'hippocampe ipsilatéral des animaux KA par l'utilisation de geNorm. À 5 h de l'injection et durant le SE, les gènes les plus stables étaient Arbp/Tbp (Figure 43A). À 7 et 21 j de l'injection, l'expression ARNm la plus stable était celle des gènes Hprt1/Tbp et Hprt1/Ppia (Figure 43B, C). Quel que soit le temps d'étude, la plus faible valeur  $V$  était obtenue avec cinq gènes (Figure 43, droite). Cependant, en combinant les trois gènes les plus stables, une normalisation fiable a été atteinte, puisque la valeur  $V$  était en-dessous 0,15 ; seuil indiquant que l'inclusion d'un gène additionnel n'était pas requis (Vandesompele et coll., 2002).

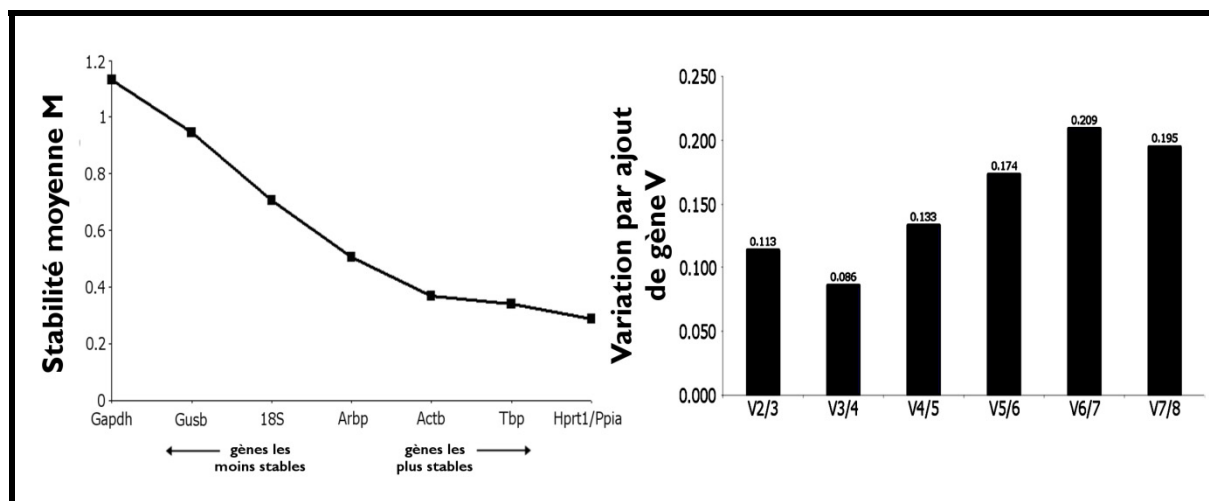
Lorsque les données de l'hippocampe controlatéral du groupe KA et de l'hippocampe du groupe NV ont été ajoutées, l'analyse geNorm a indiqué que Hprt1/Ppia étaient les gènes les plus stables. À la différence de l'hippocampe ipsilatéral, la meilleure normalisation était atteinte avec 4 gènes (plus faible valeur  $V$ ). Mais, de façon importante, la combinaison des trois gènes les plus stables (Hprt1, Ppia et Tbp ; Figure 44, gauche) permettait également une normalisation satisfaisante (Figure 44, droite).

**Figure 43. Analyse geNorm indiquant la stabilité de l'expression génique et déterminant le nombre optimal de gènes dans l'hippocampe ipsilatéral de souris injectées avec le KA**



*Graphiques de gauche* : geNorm a été utilisé pour calculer la stabilité moyenne ( $M$ ) des huit gènes étudiés dans l'hippocampe ipsilatéral des souris micro-injectées dans l'hippocampe avec le KA. Arbp/Tbp, Hprt1/Tbp et Hprt1/Ppia ont été les combinaisons les plus stables à 5 h (A), 7 jours (B) et 21 jours (C), respectivement. Pour tous ces temps d'étude, 18S, Gapdh et Gusb ont été déterminés comme les gènes les moins stables (plus grandes valeurs de  $M$ ). *Graphiques de droite* : le logiciel geNorm a été utilisé pour déterminer le nombre optimal de gènes requis pour la normalisation. Chaque barre représente les variations de l'efficacité de la normalisation après ajout d'un gène de référence supplémentaire. Le plus grand rapport  $V_5/V_6$  est relatif à l'inclusion d'un gène instable, Gapdh ou 18S, et est en accord avec l'expression de sa stabilité moyenne  $M$ . Une normalisation optimale implique l'utilisation de cinq gènes à chacun des temps étudiés (plus faible valeur  $V$ ). Cependant, l'utilisation d'une combinaison des trois gènes les plus stables est, dans nos conditions expérimentales, suffisante pour une normalisation adéquate (seuil=0,15 en référence à Vandosomepele et coll. (2002)).

**Figure 44. Analyse geNorm indiquant la stabilité de l'expression génique et déterminant le nombre optimal de gènes pour la normalisation des données de l'ensemble des groupes expérimentaux**



Lorsque les données de l'hippocampe controlatéral des souris du groupe KA et les données de l'hippocampe des souris naïves ont été ajoutées, l'analyse geNorm a indiqué Hprt1 et Ppia comme les gènes les plus stables (graphique de gauche ;  $M=0,2097$ ). De la même façon que pour l'hippocampe ipsilatéral, une normalisation valide est déterminée par la combinaison des trois gènes les plus stables (graphique de droite ;  $Hprt1, Ppia$  et  $Tbp$  ;  $V=0,113$ ).

### *III.2.2. Analyse NormFinder*

Lorsque NormFinder a été utilisé avec la même série de données, un ordre un peu différent a été obtenu concernant les cinq gènes les plus stables, et ceci en fonction de la structure analysée (Tableau 4). Arbp a été déterminé comme le plus stable dans chaque structure analysée (comparable à Ppia dans l'hippocampe ipsilatéral). De façon intéressante, 18S, Gapdh et Gusb ont toujours été identifiés comme les gènes les moins stables, quelle que soit la structure analysée (Tableau 4, ci-dessous).



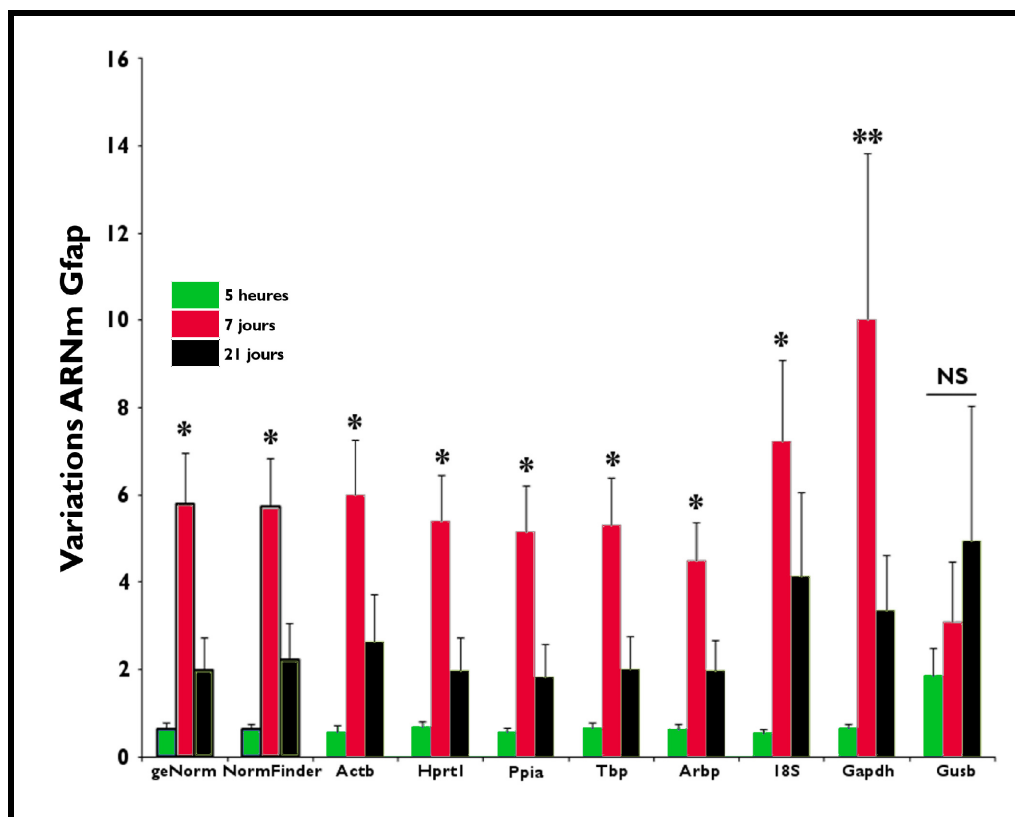
**Tableau 4. Rang et valeur de stabilité des gènes de référence calculés par NormFinder**

Gène	Hippocampe ipsilatéral	Hippocampe controlatéral	Données globales
Gapdh	<b>8</b> (24.9291)	<b>8</b> (14.7519)	<b>8</b> (19.1203)
Actb	<b>3</b> (0.2195)	<b>2</b> (3.1551)	<b>2</b> (1.5094)
Hprt1	<b>5</b> (0.226)	<b>4</b> (3.4519)	<b>3</b> (1.526)
18S	<b>6</b> (0.7941)	<b>6</b> (3.7451)	<b>6</b> (2.7322)
Arbp	<b>1</b> (0.1884)	<b>1</b> (2.8014)	<b>1</b> (1.2832)
Tbp	<b>4</b> (0.226)	<b>3</b> (3.2689)	<b>4</b> (1.6898)
Ppia	<b>1</b> (0.1884)	<b>5</b> (3.5522)	<b>5</b> (2.0081)
Gusb	<b>7</b> (13.9556)	<b>7</b> (7.783)	<b>7</b> (13.4581)
<b>Gène le plus stable</b>	<b>Arbp/Ppia</b>	<b>Arbp</b>	<b>Arbp</b>

### III.3. Influence de la stratégie de normalisation sur l'expression ARNm de Gfap

Pour mettre en relief l'importance d'une normalisation validée, les niveaux d'expression ARNm du gène cible Gfap, un marqueur astrocytaire, ont été déterminés en utilisant les trois gènes les plus stables indiqués par geNorm ou NormFinder, ou en utilisant chacun des gènes de référence individuellement durant l'évolution de l'atteinte épileptique dans ce modèle murin d'EMLT (Figure 45). Lorsque la combinaison des trois gènes les plus stables indiqués par geNorm a été utilisée (Hprt1, Ppia et Tbp), la réponse transcriptionnelle de Gfap était augmentée à 7 j par rapport à 5 h post-injection et réduite à 21 j sans retourner au niveau obtenu à 5 h. La normalisation avec les gènes déterminés par NormFinder (Arbp, Actb et Hprt1) a donné des résultats comparables. Lorsqu'un seul gène de référence, parmi les cinq les plus stables déterminés par geNorm, a été utilisé, le même schéma a été observé, avec quelques variations dans les niveaux relatifs. La normalisation avec 18S ou Gapdh a donné un schéma identique de l'expression de l'ARNm de Gfap, mais avec une augmentation plus importante et plus variable à 7 j. En revanche, la normalisation avec Gusb entraîne une perte du schéma initialement constaté, associé à une perte de significativité. Le manque de fiabilité de la normalisation avec Gapdh, 18S et Gusb n'a pas été constaté dans l'hippocampe controlatéral des animaux du groupe KA où Gfap n'était pas régulé (données non illustrées).

**Figure 45. Impact du choix des gènes utilisés pour la normalisation sur l'analyse de l'ARNm de Gfap au cours de l'évolution de la maladie épileptique au sein de l'hippocampe ipsilatéral**



La figure montre l'expression relative de l'ARNm de Gfap durant l'évolution de la maladie épileptique au sein de l'hippocampe ipsilatéral. Les données de RT-qPCR ont été normalisées avec chacun des gènes de l'étude, indépendamment. La combinaison des trois meilleurs gènes par geNorm (Hprt1, Ppia et Tbp ; voir Figure 43 et Figure 44) et NormFinder (Arbp, Ppia, actb ; voir Tableau 4) a été utilisée pour normaliser les données brutes. Les variations d'expression sont indiquées sur l'axe y. Lorsque les gènes les plus fiables, comme démontré par l'analyse geNorm et NormFinder (Actb, Hprt1, Tbp, Ppia et Tbp), ont été utilisés pour normaliser l'expression de Gfap dans l'hippocampe ipsilatéral, des variations temporelles similaires ont été détectées, consistant en une augmentation significative durant l'épileptogénèse, c'est-à-dire à 7 j post-injection ( $p=0,025$ ). En revanche, cette évolution était perdue lorsque Gusb a été utilisé pour normaliser les données. \*,  $p<0,05$  ; \*\*,  $p<0,01$  ; NS, non significatif.

#### IV. Éléments de discussion

La normalisation est une composante essentielle d'une expérimentation fiable de RT-qPCR parce que ce processus permet le contrôle des variations du taux d'extraction, de transcription inverse ainsi que de l'efficacité de l'amplification, permettant ainsi la comparaison des différents échantillons. Ces gènes de référence doivent être validés expérimentalement en fonction des conditions particulières de l'étude, dans le but de limiter

les erreurs associées à l'utilisation de gènes de référence inappropriés (Bustin et coll., 2009). Notre étude a été conçue afin de valider les gènes de référence pouvant être utilisés durant l'évolution épileptique hippocampique dans un modèle murin d'EMLT consistant en l'injection intrahippocampique unilatérale de KA.

Les variations d'expression ARNm dans notre étude ne peuvent pas être imputées à la qualité de l'étape de PCR, car la régression linéaire des huit gènes testés a indiqué une efficacité de PCR entre 91 et 100 %. L'instabilité des gènes étudiés serait donc plutôt une conséquence du processus d'épileptogénèse.

Aucun gène n'a pu être montré comme pouvant servir de gène de référence unique et optimal durant l'entière évolution du processus pathologique. Par contre, cinq gènes (Hprt1, Ppia, Tbp, Actb et Arbp) ont montré une forte stabilité dans la structure hippocampique de ce modèle murin d'EMLT. En fonction de la structure analysée, l'ordre de stabilité des gènes n'a pas été identique entre l'analyse geNorm et NormFinder, ceci probablement en relation avec l'approche mathématique qui diffère entre les deux outils (Andersen et coll., 2004 ; Vandesompele et coll., 2002). Cependant, tous deux ont permis d'identifier clairement Gapdh, 18S et Gusb comme les gènes les plus variables dans nos conditions expérimentales.

Il est remarquable que 18S et Gapdh, deux gènes de référence parmi les plus utilisés, aient montré une forte instabilité dans ce modèle d'épilepsie focale. Cette régulation génique possède un lien avec la structure analysée et n'est pas forcément inattendue compte tenu des dysfonctionnements majeurs qui font suite à l'atteinte initiale dans l'hippocampe ipsilatéral comme une perte neuronale massive, une prolifération gliale, des phénomènes de neuroplasticité ainsi que des décharges paroxystiques récurrentes focales (Bouilleret et coll., 1999 ; Heinrich et coll., 2006 ; Riban et coll., 2002 ; Suzuki et coll., 1995).

Quand les effets des huit gènes de référence potentiels ont été comparés sur un gène cible, *Gfap*, des résultats très convaincants ont été obtenus lorsque les trois gènes les plus stables déterminés par *geNorm* (*Hprt1*, *Ppia* et *Tbp*) ont été utilisés en combinaison pour la normalisation. De même, la plupart des combinaisons des cinq gènes les plus stables (*Hprt1*, *Ppia*, *Tbp*, *Actb* et *Arbp*) pourraient permettre d'effectuer une normalisation satisfaisante des données de RT-qPCR. Par contre, le choix de *Gapdh*, *18S* ou *Gusb* pourrait aboutir à des erreurs, comme montré avec *Gfap*. Une perte complète du schéma cinétique a été détectée avec *Gusb*, ce qui conduit à devoir l'exclure comme gène de référence.

Nos résultats pourraient faciliter le choix de gènes de référence pour les études d'expression RT-qPCR traitant du processus épileptique, et associant une hypersynchronisation neuronale, des phénomènes neurodégénératifs et de morts cellulaires ainsi qu'un remodelage histopathologique massif. Dans cette étude, nous avons validé des gènes de référence (*Hprt1*, *Ppia*, *Tbp*, *Actb* et *Arbp*) dont le niveau d'expression est resté stable dans l'hippocampe durant l'entière évolution du processus épileptique à la fois dans le foyer épileptique (hippocampe ipsilatéral) ainsi que dans le tissu controlatéral. En se basant sur ces résultats, si l'utilisation de *Gusb* semble inappropriée, nous recommandons l'utilisation de *Hprt1*, *Ppia*, *Tbp*, *Actb* et *Arbp* en combinaison, pour la normalisation des données d'expression des expérimentations de RT-qPCR dans ce modèle murin d'épilepsie focale. D'autres études doivent être menées visant à confirmer la stabilité de ces gènes dans d'autres modèles animaux d'épilepsie.

*- Section C -*

*Synthèse des résultats et perspectives*

## *Synthèse*

Le projet initial consistait en l'étude des modifications moléculaires et cellulaires associées à l'épileptogenèse dans deux modèles murins d'injection intrahippocampique de toxiques aux mécanismes différents : un inhibiteur de ChE, le soman et un agoniste glutamatergique, le KA. Plus précisément, nous désirions connaître la cinétique et l'ampleur de la réaction neuro-inflammatoire ainsi que son implication dans le processus d'épileptogenèse.

### **I. Modèle de micro-injection intrahippocampique de soman chez la souris**

La micro-injection intracérébrale d'agonistes cholinergique ou d'inhibiteurs des ChE est depuis longtemps associée à l'induction de décharges neuronales. Cependant, les connaissances sur les conséquences épileptogènes associées à ces mécanismes sont éparées. Nous avons ainsi cherché à définir un modèle expérimental caractérisé par une hypercholinergie hippocampique chez la souris. Nous avons ainsi pu démontrer au cours de ce travail plusieurs points importants :

- i. La micro-injection intrahippocampique de soman n'entraîne pas toujours de manifestations épileptiques initiales (SE)
- ii. Des doses de soman n'induisant pas de SE sont capables d'engendrer une épilepsie chronique
- iii. Le soman n'a pas engendré de phénomènes neurodégénératifs au sein de la structure hippocampique à des doses induisant un SE ou une épileptogenèse à long terme

Ces données sont très attractives du point de vue de la compréhension des mécanismes d'épileptogénèse et font écho à une publication récente montrant pour la première fois qu'une épilepsie chronique se développe chez des rats ne présentant pas d'épisode de SE initial après injection de pilocarpine (Navarro Mora et coll., 2009). Comme dans notre étude, aucun dommage cellulaire ou tissulaire n'a été détecté chez ces animaux. Ce résultat et celui de notre étude confirment qu'un épisode de SE, ainsi qu'une neurodégénérescence initiale ou secondaire ne semblent pas être, au moins dans certains cas, des événements indispensables au développement de l'épilepsie chez la souris. Les connaissances restreintes sur notre modèle expérimental utilisant le soman ne permettent pas actuellement de le relier à un type particulier d'épilepsie humaine. Les mécanismes d'épileptogénèse restent notamment à définir plus précisément.

Le rôle de l'hippocampe dans les processus mnésiques est bien connu. Un des mécanismes utilisés pour le traitement de la perte de mémoire est d'augmenter la concentration en ACh dans les structures limbiques. Les inhibiteurs des ChE, couramment utilisés dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, ne sont pas dénués d'effets secondaires. Ainsi, récemment, deux études cliniques, décrivant des résultats préliminaires concernant les effets du donepezil, un inhibiteur des ChE, ont rapporté des effets contradictoires sur la fréquence des crises, chez des patients souffrant d'épilepsie partielle (Fisher et coll., 2001; Hamberger et coll., 2007). Ces données, en plus de confirmer les effets potentiellement délétères à long terme d'une dérégulation cholinergique, suggèrent des mécanismes divers dans le processus d'épileptogénèse. Au vue de nos travaux, il nous semble pouvoir affirmer que la création d'un terrain épileptique dans notre modèle n'implique que très modérément les phénomènes inflammatoires. Nous ne pouvons cependant pas exclure qu'une neuro-inflammation plus importante résultant d'événements initiaux plus sévères (SE, dégradations cellulaires et tissulaires) puisse contribuer à l'épileptogénèse dans d'autres conditions.

## II. Modèle de micro-injection intrahippocampique de KA chez la souris

Le modèle de micro-injection intrahippocampique de KA est un modèle pertinent d'EMLT, dont les modifications cellulaires et morphologiques associées au processus d'épileptogénèse dans l'hippocampe ipsilatéral sont bien caractérisées. De façon surprenante, peu de données sur les événements neuro-inflammatoires sont disponibles dans ce modèle.

Nos travaux expérimentaux ont pu apporter quelques notions importantes. Dans ce modèle d'EMLT, la réaction inflammatoire est d'induction précoce durant l'épileptogénèse et régio-spécifique puisque celle-ci est très intense au sein de l'hippocampe ipsilatéral. Nous pouvons caractériser deux phénomènes :

- i. Une réaction inflammatoire aiguë (2-3 j) localisée à proximité des zones neurodégénératives et caractérisée par une activation microgliale intense et l'absence d'activation astrocytaire
- ii. Une réaction inflammatoire chronique ipsilatérale (7-21 j) caractérisée par une hypertrophie et un envahissement des cellules astrogliales associée à une disparition des cellules microgliales détectables au sein de l'hippocampe ipsilatéral

L'induction ipsilatérale de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  reflète bien cette réaction neuro-inflammatoire « biphasique ». Le système IL-1 est stimulé exclusivement, et de façon précoce, au sein de l'hippocampe ipsilatéral. De plus, la résistance des neurones hippocampiques controlatéraux au site d'initiation du SE par le KA dans ce modèle est associée à une absence d'induction de l'ARNm d'IL-1 $\beta$  dans cette structure. Ces données renforcent l'hypothèse d'un rôle majeur de la voie IL-1 dans la cascade neuropathologique et pro-épileptogène dans ce modèle d'épilepsie. L'induction de la production d'IL-1Ra, l'antagoniste endogène des récepteurs à l'IL-1, semble intervenir trop tard pour pallier aux effets délétères de l'IL-1. Ce découplage temporel a déjà été rapporté dans d'autres modèles



d'épilepsie. D'autres signaux semblent diffuser facilement au sein de la structure cérébrale. Notamment, le profil d'induction de l'ARNm de SOCS3, un marqueur de l'augmentation de la transduction de signaux cytokiniques, dont celui de l'IL-6, refléterait majoritairement le phénomène d'activation astrocytaire, qui est uniforme dans la structure controlatérale à 48 h, tandis qu'il est absent dans les zones de neurodégénérescence au sein de l'hippocampe ipsilatéral.

Le préconditionnement neuro-inflammatoire induit par le LPS semble pouvoir diminuer la sévérité de l'atteinte sclérotique de l'hippocampe sans interférer avec les caractéristiques des crises récurrentes. Le traitement par un inhibiteur de COX-2 semble interférer avec l'ictogénèse dans nos conditions expérimentales. Bien que cela reste à confirmer et à mieux caractériser, il semble que, dans le cas du KA, la neuro-inflammation puisse avoir un rôle dans l'épileptogénèse (ictogénèse) ou dans certains événements qui lui sont associés (SH).

Déterminer les caractères bénéfiques ou délétères de la neuro-inflammation reste un enjeu expérimental important. Ces caractérisations pourraient être déterminantes dans le développement de nouvelles thérapeutiques anti-épileptogènes.

### **III. Normalisation des données de RT-qPCR**

Nous tenions à vérifier l'importance d'une normalisation adéquate des données de RT-qPCR, seule garante de résultats fiables. Nos résultats nous ont permis de mettre en évidence une modification génique dépendante du processus d'épileptogénèse dans le modèle d'injection intrahippocampique de KA chez la souris. Cette modification peut concerner des gènes classiquement utilisés comme gènes référents stables dans de nombreuses études de RT-qPCR. Vérifier la stabilité des gènes de référence dans une condition expérimentale donnée est d'une importance primordiale. Notre étude nous a permis de révéler la stabilité

d'un certain nombre de gènes au cours de l'épileptogenèse qui pourraient servir de gènes référents au cours de l'épileptogenèse.

## *Perspectives*

Nos travaux ont permis tout d'abord de montrer l'existence d'une épileptogenèse après micro-injection intrahippocampique de soman et d'initier l'étude de ses caractéristiques et de ses mécanismes. Le processus neuro-inflammatoire et ses rôles potentiels dans l'épileptogenèse provoquée par la micro-injection intrahippocampique de KA ont commencé à être explorés. De nombreuses questions restent cependant posées. Les quelques perspectives expérimentales proposées ci-dessous, bien que non exhaustives, pourrait aider à résoudre au moins une partie de ces questions.

### **I. Modèle de micro-injection intrahippocampique de soman chez la souris : perspectives expérimentales**

#### **I.1. Description des événements neurochimiques locaux**

Il nous semble important de séquencer les événements neurochimiques initiaux prenant place au cours des premières heures de l'intoxication. Une meilleure connaissance dans ce domaine pourrait nous permettre de relier l'augmentation progressive de l'excitabilité hippocampique et de l'activation neuronale observées durant notre étude à des variations de concentration en neurotransmetteurs (ACh, Glu et GABA). Ce but pourrait être atteint grâce à la microdialyse intracérébrale, méthode de choix utilisée couramment pour déterminer les variations de concentrations extracellulaires de neurotransmetteurs dans le cerveau de modèles animaux expérimentaux (Meurs et coll., 2008). Les résultats pourraient être comparés avec ceux obtenus après injection systémique de soman (Grasshoff et coll., 2003; Lallement et coll., 1991) ou injection intrahippocampique de pilocarpine chez le rat

(Smolders et coll., 1997; Smolders et coll., 2004). L'injection intrahippocampique de soman entraîne-t-elle une libération extracellulaire de Glu et si oui, de quelle importance est-elle sont des questions que ces expérimentations permettraient en principe de résoudre.

Nos résultats ont montré que l'injection focale de soman entraînait, sur le long terme, un déficit fonctionnel (REC contextuelle) qui pourrait être lié à une diminution de la neurotransmission cholinergique hippocampique (voir page 96 et 107). Cette hypothèse pourrait être vérifiée en étudiant, par exemple, la distribution cellulaire et subcellulaire des récepteurs cholinergiques dans les mois qui suivent l'injection intrahippocampique. Une étude, utilisant la détection immunohistochimique du récepteur M2 par microscopie optique et électronique, associée à une analyse qualitative et quantitative des coupes pourrait nous servir de base méthodologique (Bernard et coll., 2003). L'analyse par RT-qPCR des variations de l'ARNm des gènes codant pour les différentes protéines composant ces récepteurs pourrait être envisagée. Enfin, l'analyse (dosage enzymatique, histochimie) d'autres marqueurs de la fonction cholinergique de l'hippocampe tels que les enzymes de synthèse et de dégradation de l'ACh (choline acétyltransférase, AChE) pourrait nous offrir un complément intéressant à cette étude d'ensemble.

## **I.2. Vérification de l'absence de composante structurale dans l'épileptogénèse associée à la micro-injection intrahippocampique de soman**

Nos travaux n'ont jusqu'ici pas pu démontrer de liens formels entre le processus d'épileptogénèse et une quelconque atteinte tissulaire ou cellulaire. Cependant, la plupart des méthodes histologiques utilisées ne permettaient pas de détecter tous les types de modifications structurales. Pour sa part, la méthode d'imprégnation argentique de Golgi sur coupes épaisses, n'a fait l'objet que de travaux préliminaires sur un nombre d'animaux excessivement restreint. Pour le moment, elle n'a pas permis de montrer, chez la souris, de

malformations des arbres dendritiques de cellules du GD (*windblown neurons*) comme cela a été décrit sur des prélèvements *post-mortem* de malades épileptiques (Scheibel et coll., 1974). Ceci demande à être confirmé sur un nombre plus large d'animaux. D'autre part, l'imprégnation argentique permet d'accéder à des aspects structuraux plus subtils. Il a été en effet montré par cette méthode que l'injection systémique de soman pouvait entraîner une diminution très rapide (60 min post-intoxication) des épines dendritiques des neurones pyramidaux de CA1 (Carpentier et coll., 1991). Ce résultat a été interprété comme une tentative de désafférentation suite à l'excès de Glu extracellulaire, les épines étant un site privilégié pour les synapses fonctionnant au Glu et utilisant le récepteur NMDA. L'examen de ces épines dendritiques au cours des différentes phases de l'épileptogénèse pourrait nous donner un éclairage indirect sur le rôle du Glu dans cette pathologie.

### **I.3. Rôle de la modulation neuro-inflammatoire dans la protection histologique de la structure hippocampique ?**

Dans notre étude, nous avons constaté, suite à la micro-injection de soman, l'absence de réaction microgliale, de transcription d'IL-1 $\beta$  et de neuropathologie. Il est possible que l'ensemble de ces observations soit relié à un rôle important du récepteur  $\alpha 7$  nicotinique. En effet, ce dernier pourrait être stimulé par l'hypercholinergie induite par le soman, cette stimulation pouvant à son tour diminuer la réponse microgliale et donc la synthèse de cytokines pro-inflammatoires du type IL-1 $\beta$  par les cellules microgliales (Pavlov et coll., 2009 ; Tyagi et coll., 2009a ; Tyagi et coll., 2009b). En conséquence, la réaction neuro-inflammatoire serait réduite et son rôle éventuel dans les processus neurodégénératifs amoindri. Un effet neuroprotecteur de la stimulation du récepteur  $\alpha 7$  nicotinique pourrait être plus direct en diminuant la libération du Glu et la stimulation du récepteur NMDA (Shimohama, 2009). Cette hypothèse pourrait être testée *in vivo* sur notre modèle par l'injection d'antagonistes des récepteurs  $\alpha 7$  nicotiniques comme la methyllycaconitine (Tyagi

et coll., 2009b). Si l'hypothèse est juste, ce traitement devrait augmenter la réaction microgliale et peut-être les effets neuropathologiques au cours de l'épileptogenèse dans le modèle de micro-injection intrahippocampique de soman.

## **II. Modèle de micro-injection intrahippocampique de KA chez la souris : perspectives expérimentales**

Parmi les nombreuses études possibles, il nous semble important d'étayer les points suivants :

### **II.1. Implication des cellules microgliales dans les événements associés à l'épileptogenèse**

L'activation précoce des cellules microgliales est un événement majeur de la réaction neuro-inflammatoire dans ce modèle. Il a été démontré récemment que le traitement par la nicotine était susceptible de protéger les neurones en supprimant la neurotoxicité et l'activation microgliale induite *in vitro* par la thrombine (Ohnishi et coll., 2009). Pour déterminer dans notre modèle le rôle des récepteurs nicotiques dans la régulation de la réponse neuro-inflammatoire observée, nous proposons l'étude de la modulation de l'activation microgliale par des agonistes des récepteurs nicotiques (comme la nicotine). Ces derniers devraient diminuer la réponse microgliale (Shytle et coll., 2004). L'étude des conséquences histologiques associées pourrait permettre de mieux définir le caractère bénéfique ou délétère de l'activation microgliale précoce.

A plus long terme, nous avons constaté l'absence de cellules IB4-positives à partir de 7 j après le SE induit par le KA. Cette absence pourrait s'expliquer de deux manières :

(i) elle pourrait correspondre à l'absence des cellules microgliales elles-mêmes. Cette possibilité pourrait être vérifiée par l'utilisation d'autres marqueurs (par exemple CD11).

(ii) elle pourrait être liée à une diminution de la « spécificité » de la lectine pour les cellules microgliales. En effet, la lectine IB4 se lie spécifiquement aux résidus galactose exprimés à la surface de nombreuses cellules, dont les cellules endothéliales (Benton et coll., 2008 ; Franz et coll., 2006). Il est ainsi possible que l'angiogénèse, qui est associée à l'EMLT chez l'homme (Rigau et coll., 2007), multiplie le nombre de cibles pour la lectine, « diluant » ainsi le marquage et diminuant sa spécificité pour les cellules microgliales.

Pour appuyer cette hypothèse, une étude de l'angiogénèse et du marquage par IB4 des vaisseaux néoformés devrait être réalisée.

## **II.2. Rôle pro-épileptogène de l'IL-1**

Nous avons montré que l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  est présent uniquement au sein de l'hippocampe ipsilatéral, suggérant un rôle pivot du système IL-1 dans les premières étapes de l'épileptogénèse. Nous avons également constaté que l'augmentation de la quantité d'ARNm d'IL-1Ra, inhibiteur endogène de la voie de l'IL-1, semble s'initier trop tardivement dans ce modèle. Nous proposons l'étude des effets sur l'épileptogénèse induite par le KA d'une inhibition de l'action d'IL-1 $\beta$ . Pour cela, nous utiliserions l'anakinra, un recombinant de l'IL-1Ra. L'injection serait réalisée dans l'hippocampe ipsilatéral, siège des variations majeures de l'IL-1 $\beta$ , au cours des premières heures suivant l'injection de KA. La micro-injection intrahippocampique d'IL-1Ra a déjà été étudiée dans un modèle utilisant la bicuculline, avec des effets majeurs sur la diminution de l'excitabilité neuronale (Vezzani et coll., 2000). Une telle administration d'anakinra dans ce modèle pourrait nous permettre de mieux caractériser le rôle de la voie de l'IL-1 dans l'épileptogénèse.

### **II.3. Étude des mécanismes du préconditionnement par le LPS**

Nos travaux sur le modèle KA nous ont montré que l'administration de LPS, un promoteur de neuro-inflammation, pouvait avoir des effets neuroprotecteurs. Par quels mécanismes cet effet a-t-il été obtenu reste à préciser. Une analyse fine par RT-qPCR des effets du LPS, dans les heures qui suivent son injection, sur les messagers précédemment sélectionnés (système IL-1, SOCS3 et COX-2) pourrait déjà donner des éléments de réponse sur les mécanismes initiaux de la neuro-inflammation induite par le LPS seul ou en présence de KA.

Une étude histologique parallèle nous permettrait aussi de déterminer la cinétique d'activation astrocytaire, de vérifier si le LPS permet l'accession des astrocytes dans les zones de dégénérescence suite à l'injection de KA et éventuellement de suggérer un rôle des astrocytes dans la neuroprotection induite par le LPS.

## *Section D*

### *Matériels et méthodes*

---



## *Animaux et procédures in vivo*

Toutes les expérimentations sur l'animal décrites ci-dessous ont été réalisées en accord avec le comité d'éthique de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées-Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (IRBA-CRSSA) en accord avec la législation européenne (décret 86/609) et française (décret 87/848) régissant l'expérimentation animale. Tous les efforts ont été mis en œuvre pour diminuer la souffrance des animaux et réduire leur nombre au cours des expériences.

### **I. Animaux**

Les animaux utilisés étaient des souris mâles de souche C57BL/6 fournies par Janvier (Le-Genest-St-Isle, France) et âgées de 8 à 10 semaines. Les animaux ont été réceptionnés à l'âge de 6 à 8 semaines et acclimatés aux conditions d'hébergement de l'animalerie du département de Toxicologie de l'IRBA-CRSSA. La période lumineuse (7-19 h), la température ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et l'hygrométrie ( $45 \pm 3\%$ ) étaient contrôlées. Les animaux ont été stabulés par groupe de 5 à 10 pendant 15 j dans des cages adaptées transparentes. Les animaux ont eu un accès illimité à l'eau et à la nourriture. À la suite des procédures chirurgicales permettant l'induction du processus d'épileptogenèse (voir ci-dessous), les animaux ont été hébergés en cage individuelle afin de favoriser leur récupération physiologique. Un traitement identique a été réservé aux animaux témoins.

### **II. Procédure anesthésique**

Une solution à 4 % d'hydrate de chloral (Sigma-Aldrich, Lyon, France) a été réalisée dans du sérum physiologique (800 mg/20 mL), conservée à  $4^\circ\text{C}$  et renouvelée quotidiennement. L'anesthésie préchirurgicale a été effectuée par l'injection ip de cette solution à une dose de

400 mg/kg. L'intervention chirurgicale est intervenue après contrôle de la profondeur de l'anesthésie (absence de réactivité après pincement de la queue), qui était complète généralement dans les 20-30 min après l'injection de la solution anesthésique. Cette procédure a permis une anesthésie d'environ 90 à 120 min, temps nécessaire pour l'injection intrahippocampique et la pose d'électrodes pour le suivi EEG.

### **III. Procédures chirurgicales et induction de l'épileptogenèse**

La micro-injection intrahippocampique a été utilisée afin d'étudier le processus d'épileptogenèse chez la souris C57BL/6. Les animaux anesthésiés ont été placés dans un cadre stéréotaxique adapté (Kopf Instrument, Roucaire, France) sur une banquette chauffante pour limiter la baisse de température corporelle induite par l'anesthésie générale. Après protection contre le dessèchement oculaire (Ocrygel<sup>®</sup>; Virbac, Carros, France) et décontamination alcoolique de la surface de la peau du crâne, une incision médio-sagittale a été effectuée pour exposer le crâne de l'animal, et un trou (~1 mm de diamètre) a été foré à l'aide d'une fraise adaptée au-dessus de l'hippocampe dorsal droit selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes : antéropostérieures (AP) : -2 mm ; médiolatérales (ML) : -1,5 mm ; dorsoventrales (DV) : -2 mm ; en utilisant le bregma comme référence (Figure 46), d'après Paxinos et Franklin (2001). Les coordonnées DV du lambda ont été également contrôlées afin de vérifier l'horizontalité du crâne au sein de l'appareil stéréotaxique. La solution appropriée (soman, KA ou sérum physiologique) a ensuite été injectée dans l'hippocampe dorsal droit de la souris (hippocampe ipsilatéral) en utilisant une canule en acier inoxydable (diamètre extérieur de 0,28 mm ; Phymep, Paris France) connectée à une microseringue de contenance 0,5 µL (Hamilton, Bonaduz, Suisse) *via* un tube en polyéthylène (PE-20 ; Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France). Les injections ont été effectuées pendant 1 min en utilisant une micropompe (CMA/100 ; Carnegie Medicine, Stockholm, Suède). À la fin de l'injection, la

canule a été laissée en place 2 min supplémentaires pour limiter le reflux le long du trajet d'injection. Toutes les injections de soman ont été effectuées entre 8 à 13 h afin de limiter l'impact circadien sur les expérimentations effectuées. La grande majorité des injections de KA ont également été effectuées durant cette plage horaire.

Une autre procédure d'injection a été effectuée chez certains animaux afin d'étudier les effets électrophysiologiques précoces de la micro-injection intrahippocampique de soman. Les procédures liées à cette expérimentation sont consignées page 185.

### **III.1. Préparation des solutions d'injection intrahippocampique**

#### ***III.1.1. Acide kaïnique***

Le syndrome d'EMLT a été modélisé chez la souris par l'injection intrahippocampique d'1 nmol de KA (Bouilleret et coll., 1999 ; Riban et coll., 2002). La solution d'injection (20 mM) a été constituée par la dilution de 10 mg d'acide kaïnique (MM de 231,25 g/mol ; Sigma-Aldrich, Lyon, France) dans 2,16 mL de sérum physiologique, distribuée en aliquotes de 50 µL conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Cinquante nanolitres de cette solution ont permis l'injection intrahippocampique d'1 nmol de KA. Chaque aliquote a été conservé à 4°C entre chaque injection et renouvelé quotidiennement.

#### ***III.1.2. Soman***

##### ***a. Caractéristiques physiques et données de sécurité***

Le soman (densité de 1,02 et MM de 182 g/mol ; pureté > 97% par analyse chromatographique en phase gazeuse) a été fourni par le Centre d'Etudes du Bouchet (CEB, Vert-Le-Petit, France). La préparation des solutions diluées de soman a été effectuée sous hotte filtrante par une personne habilitée, équipée de gants butyl et d'un masque de protection

respiratoire (F. Dorandeu). Le principal danger associé à la procédure de micro-injection intrahippocampique réside dans l'inhalation des vapeurs toxiques émises par la solution d'injection. Ainsi, les expérimentations ont été effectuées dans une pièce de grand volume et la période durant laquelle la dilution est susceptible d'émettre des vapeurs en dehors d'une hotte a été minimisée. La procédure a impliqué deux personnes, toutes deux équipées d'un masque de protection respiratoire muni d'une cartouche filtrante A2B2P3. La protection respiratoire était notamment indispensable durant les phases d'aspiration et de purge de la solution d'injection.

### **i. Préambule**

Pour réaliser l'injection de 11 nmol de soman (soit 2 µg) dans un volume de 50 nL (volume basé sur l'injection intrahippocampique de KA), il a été nécessaire de constituer une solution de 40 mg/mL. Cette solution ne peut pas être préparée directement dans le sérum physiologique en raison de la solubilité du soman dans ce véhicule (environ 21 g/L d'après la fiche de données de sécurité du CEB). Elle a donc été préparée dans de l'isopropanol anhydre à partir d'aliquotes de soman pur et conservée en aliquote de 100 µL à -30°C dans des flacons adaptés. Le jour de l'expérimentation, les aliquotes nécessaires ont été décongelées et placées sous hotte dans un portoir placé dans du charbon actif. Contrairement à ce qui pouvait être fait avec la solution de KA, il n'a pas été possible de contrôler visuellement l'apparition d'une goutte de 50 nL à l'extrémité de la canule d'injection à la fin de l'injection. Il est possible qu'une différence de tension de surface et de volatilité de la solution soit en cause. Ce contrôle visuel permettait notamment de s'assurer que la canule n'était pas bouchée lors de l'injection. De plus, l'étude préliminaire qui portait sur trois souris de souche Swiss (Janvier) n'a pas permis d'observer d'effets physiologiques, EEG et histologiques notables (données non illustrées). L'ensemble de ces éléments a conduit à renoncer à ce protocole d'injection.

## **ii. Protocole d'injection du soman**

Une solution de 20 mg/mL a pu être obtenue par dilution extemporanée de soman pur dans du sérum physiologique et ainsi permettre l'injection intrahippocampique des 11 nmol dans un volume de 100 nL. La solution de soman à 20 mg/mL a été effectuée sous hotte avec une protection cutanée adaptée, quelques heures avant l'injection et conservée dans la glace. Du soman pur (5 µL soit 5 mg) a été aspiré à l'aide d'une pipette à déplacement positif à embout jetable (0-10 µL) et placé dans un flacon en verre contenant 245 µL de sérum physiologique. La dilution a été longuement agitée au vortex.

Pour les doses d'injection inférieures à 11 nmol (4 ; 2,8 ; 2 ; 1 ; 0,75 et 0,53 nmol), un volume d'injection de 50 nL a été utilisé en référence aux études utilisant le KA (Bouilleret et coll., 1999) ; les différentes doses ont été obtenues en faisant varier la concentration de la solution préparée extemporanément (1,9 à 20 mg/mL).

### ***III.1.3. Constitution du groupe témoin des procédures***

Le groupe témoin (TEM) a été constitué par des animaux injectés dans l'hippocampe dorsal droit avec 50-100 nL de sérum physiologique, afin d'évaluer les effets propres du KA ou du soman en maintenant comparables les autres facteurs. Certaines expérimentations ont fait appel à des souris naïves. Ce groupe a été formé par des animaux n'ayant pas subi d'intervention chirurgicale ou d'injection intrahippocampique.

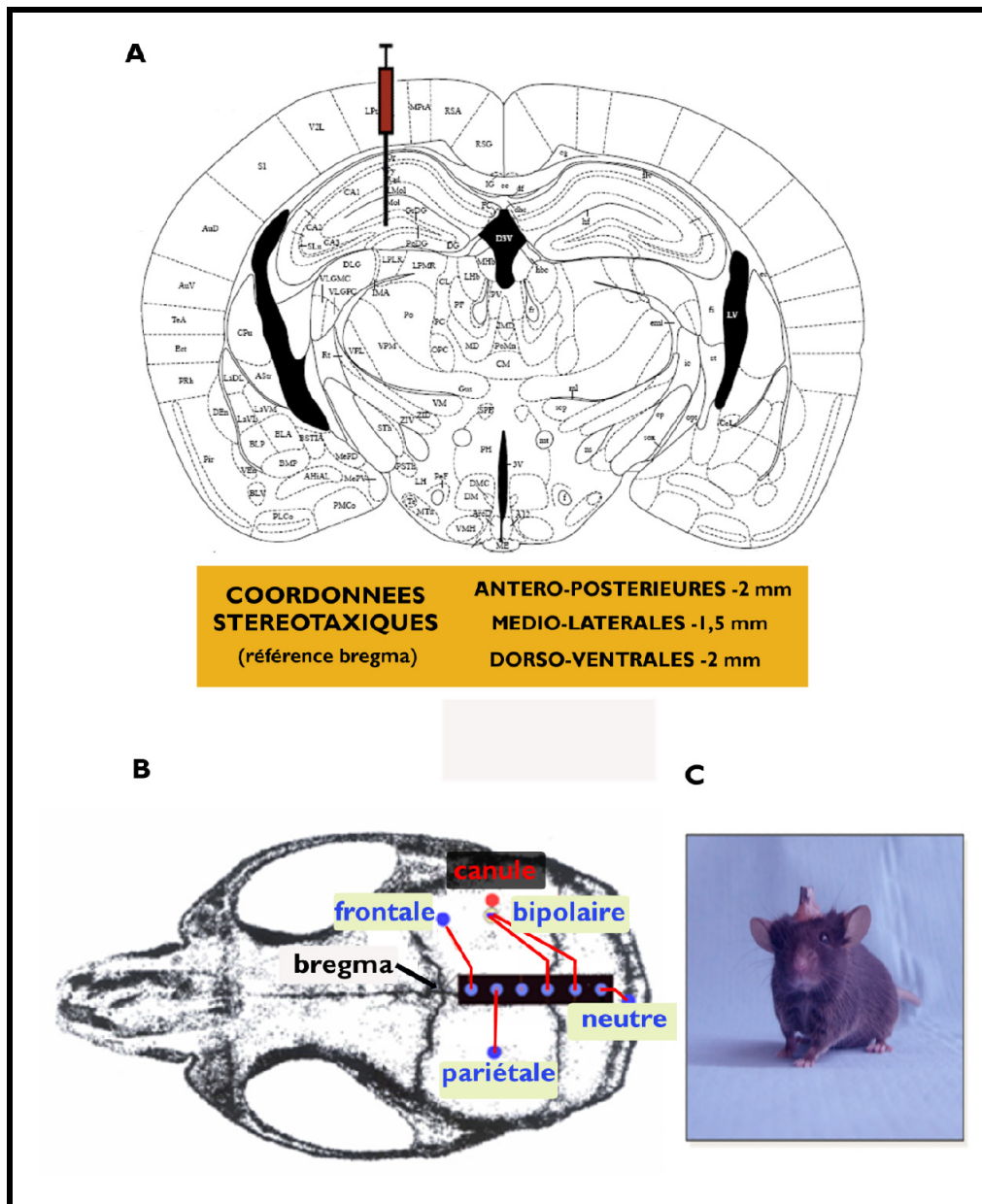
## **IV. Implantation des électrodes et suivi électro-encéphalographique**

Pour les expérimentations impliquant un enregistrement du tracé EEG, une électrode profonde atteignant l'hippocampe dorsal droit injecté ainsi que des électrodes corticales de surface ont été implantées à la suite de l'injection intrahippocampique. L'électrode hippocampique a été constituée à l'aide de deux fils d'acier inoxydable isolés par du

polyester et dont les extrémités se trouvaient séparées verticalement par 0,3-0,5 mm. Un contrôle de la qualité de la fabrication a été effectué visuellement sous loupe binoculaire et par une vérification de la conduction électrique. L'électrode a été implantée, après injection intrahippocampique, suivant les mêmes coordonnées que l'injection (AP : -2mm ; ML : -1,5 mm ; DV : -2 mm). Après avoir foré le crâne de l'animal, trois électrodes de surface ont été placées bilatéralement au niveau du cortex frontal, et au niveau du cortex pariétal de l'hémisphère gauche. Une électrode de référence a été placée au-dessus du vermis du cervelet. Les électrodes ont été ensuite soudées à un connecteur multifiches mâle et solidement fixé au crâne de l'animal à l'aide de ciment dentaire et de cyanoacrylate (voir Figure 46).

Chaque animal destiné à l'étude EEG a ensuite été placé dans une enceinte en Plexiglas permettant son observation et relié à un électro-encéphalographe (filtre passe-bande entre 0,5 et 50 Hz ; Reega Minidix TR, Alvar Electronic, Paris, France). En raison de leur caractérisation exhaustive et de leur grande reproductibilité (Bouilleret et coll., 1999 ; Riban et coll., 2002), les événements EEG associés à la micro-injection intrahippocampique de KA chez la souris ont été enregistrés pendant 2-3 h, majoritairement durant la période allant de 13 à 17 h. En revanche, les animaux ayant reçu une injection intrahippocampique de soman et destinés à l'étude EEG, ont été enregistrés de façon continue pendant des sessions de 24 h. Les signaux EEG enregistrés chez l'animal libre de ses mouvements ont été numérisés et traités par transformée de Fourier à 200 Hz à l'aide d'un logiciel d'analyse développé au sein du laboratoire par le Dr Testylier et basé sur l'interface Labview (National Instruments, Austin, États-Unis).

Figure 46. Micro-injection intrahippocampique et pose d'électrodes chez la souris



(A), durant l'anesthésie générale, les souris ont été injectées avec une solution d'étude dans l'hippocampe dorsal droit selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes : antéropostérieures : -2 mm ; médiolatérales : -1,5 mm et dorsoventrales : -2 mm, en référence au bregma selon les coordonnées de Paxinos et Franklin (2001). (B), pour l'étude EEG, une électrode bipolaire profonde au niveau du site d'injection et trois électrodes monopolaires de surface ont été installées sur le crâne de la souris. L'électrode neutre a été placée au-dessus du vermis du cervelet. (C), l'ensemble a été ensuite solidarisé à l'aide de ciment dentaire.

# *Procédures ex-vivo*

## **I. Préparation des tissus frais**

### **I.1. Microdissection de structures cérébrales et extraction des ARN totaux**

#### ***I.1.1. Microdissection***

Les souris ont été sacrifiées par décapitation. Les cerveaux, immédiatement extraits de la boîte crânienne, ont été placés sur un plan de travail réfrigéré dans un environnement dénué d'ARNases. La microdissection des structures cérébrales d'intérêt a alors été effectuée. Les structures cérébrales ont été pesées et placées alors dans un volume de RNALater<sup>®</sup> (Quiagen, Courtaboeuf, France) pendant 24 h à 4°C puis congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

#### ***I.1.2. Extraction des ARN totaux***

Après décongélation, les structures cérébrales ont été broyées et homogénéisées dans un tampon phénolé (RNA Instapure<sup>®</sup>, 400 µL ; Eurogentec, Angers, France). Les acides nucléiques (AN) ont été extraits par l'ajout de 40 µL de chloroforme dans l'homogénat suivi de centrifugations successives. La phase aqueuse supérieure contenant les AN a été délicatement récupérée puis mise dans 70 µL d'isopropanol. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot d'AN a été lavé dans 0,3 mL d'éthanol à 75 %. Après une nouvelle centrifugation et élimination de l'éthanol, les culots ont été rapidement séchés à 37°C puis repris dans 35 µL d'eau pour préparation injectable (PPI). Après mélange au vortex à vitesse lente, les échantillons ont été congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.





## II. Préparation des tissus perfusés

### II.1. Réalisation des coupes paraffinées

Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'une dose létale de pentobarbital sodique (80 mg/kg ip ; Ceva Santé Animale, Libourne, France), puis perfusées par voie intracardiaque à raison de 5 mL/min à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex, Illkirch, France). La perfusion est débutée par l'insertion dans le ventricule gauche d'une canule de perfusion, suivie par l'incision de l'oreillette droite pour éviter une surpression dans le système circulatoire. La première solution de perfusion est constituée de 25 mL sérum physiologique hépariné à 5 UI/mL qui permet l'exsanguination de l'animal. La fixation est ensuite effectuée par une solution de formaldéhyde acétique à 4% dans du sérum physiologique (30 mL). Les animaux perfusés sont ensuite placés en chambre froide à 4°C pendant un minimum de 2 h. Après décapitation, les cerveaux ont été délicatement retirés de la boîte crânienne et ont été placés dans une solution de post-fixation constituée de formaldéhyde 4 % pendant 24 h.

Les cerveaux perfusés ont été ensuite inclus dans la paraffine. Pour cela, les cerveaux ont été rincés toute une nuit sous l'eau courante puis déshydratés dans des bains d'éthanol de concentration croissante, puis de butanol et enfin, inclus dans la paraffine (Histomed<sup>®</sup> standard, Labo-Moderne, Paris, France) à l'aide de trois bains successifs à 58-60°C. Les blocs ont ensuite été coulés dans des cassettes adaptées. Les cerveaux perfusés ont été coupés en tranches frontales de 7 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (Leica, Wetzlar, Allemagne) et étalées sur lames prétraitées au 3-aminopropyl-triéthoxysilane à 2% afin de favoriser l'adhérence des coupes. La région de l'hippocampe :~0 mm à -3 mm à partir du bregma selon l'axe rostro-caudal, d'après Paxinos et Franklin (2001) a été le niveau d'étude afin notamment de vérifier la localisation correcte du site d'injection.

## **II.2. Réalisation des coupes flottantes**

L'ensemble de la procédure de fixation est identique à celle des coupes paraffinées, excepté le fixateur qui a été remplacé par du paraformaldéhyde (PF) à 4 % préparé dans un tampon phosphate (PB, pH~7,4 à 0,1 M) et maintenu à 4°C. Après passage dans une solution de post-fixation constituée de PF 4 % pendant 2 h, les cerveaux ont été déshydratés durant 48 h dans une solution de saccharose à 30% pour optimiser leur cryoconservation. Les cerveaux ont été ensuite congelés dans l'isopentane à -40°C pendant 1 min avant d'être conservés au congélateur à -80°C.

Les cerveaux perfusés ont été coupés à -20°C en tranches frontales de 40 µm au niveau de la région hippocampique :~0 à -3 mm à partir du bregma selon l'axe rostro-caudal, d'après Paxinos et Franklin (2001), à l'aide d'un cryostat et recueillies dans des boîtes 24 puits (Corning, Amsterdam, Pays-Bas) contenant un mélange de tampon phosphate/sodium (PBS ; PB 0,1 M et NaCl 0,15 M) et d'azide de sodium à 0,1%. Les coupes ont alors été conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

## **III. Détections histochimiques**

### **III.1. Sur coupes paraffinées**

#### ***III.1.1. Traitements préalables des coupes paraffinées***

Les coupes paraffinées ont subi une étape d'hydratation préalable aux études histochimiques et immunohistochimiques. Cette étape a été réalisée par passages successifs dans des bains de toluène, ainsi qu'une succession de bains d'alcool de titre décroissant.

### ***III.1.2. Coloration à l'hémalun-phloxine***

Après séchage, les coupes ont été colorées 3 min dans l'hémalun (hémateïne 0,2%, Sigma-Aldrich, Lyon, France ; alun de potassium 5% et acide acétique 2%), rincées à l'eau claire et différenciées dans l'alcool acide (alcool 95% ; HCl 0,15%). Un lavage 5 min à l'eau claire a été ensuite effectué, suivi de la coloration à la phloxine à 3% pendant 5-30 s et d'un rinçage à l'eau claire. Les coupes colorées ont ensuite été déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante et deux bains de toluène, puis montées entre lame et lamelle avec de l'histolaque.

L'hémateïne va colorer spécifiquement les noyaux cellulaires en bleu/violet. Les cellules en souffrance, dont le pH cytoplasmique diminue, vont se colorer en rose/rouge grâce aux propriétés acidophiles de la phloxine. Cette double coloration permet donc le repérage anatomique des coupes le long de l'axe rostro-caudal à l'aide de l'atlas de Paxinos et Franklin (2001), ainsi que la visualisation des événements neurodégénératifs et de l'œdème cérébral.

### ***III.1.3. Détection histochimique des cellules microgliales***

Les cellules microgliales ont été marquées par l'isolectine IB4 provenant de *Griffonia simplicifolia*, et marquée à la peroxydase (GSA-IB4, Sigma-Aldrich, Lyon, France), d'après un protocole adapté de Streit et Kreutzberg (1987). Les coupes ont été incubées toute la nuit à 4°C en chambre humide avec la GSA-IB4 (15 µg/mL) dans un tampon phosphate 0,1 M contenant CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, et MnCl<sub>2</sub> (0.1 mM chacun). Les lames ont ensuite été rincées dans un tampon phosphate (3 x 5 min) puis révélées par une solution de diaminobenzidine (DAB). La réaction a été stoppée par l'immersion des coupes dans l'eau distillée.

### ***III.1.4. Visualisation des fibres moussues***

Les animaux destinés à l'étude de visualisation des fibres moussues hippocampiques ont nécessité un protocole de perfusion spécifique. Après exsanguination, les animaux ont été fixés avec 50 mL d'une solution de sulfite de sodium à 0,37% ( $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $9\text{H}_2\text{O}/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ; pH~2) puis avec une solution de formaldéhyde acétique à 4% dans du sérum physiologique (30 mL). Après leur réalisation (voir page 173), les coupes paraffinées ont été incubées dans une solution de révélation contenant 48% de gomme arabique, 3,8% d'acide citrique, 3% de citrate de sodium, 2% d'hydroquinone et 0.8% de nitrate d'argent, à température ambiante (TA) et dans l'obscurité, pendant 50 min. Les coupes ont ensuite été rincées 2x5 min dans l'eau distillée.

### **III.2. Sur coupes flottantes**

Les événements neurodégénératifs ont été analysés sur coupes flottantes par une technique de coloration argentique à l'aide d'un kit commercial selon les recommandations du fournisseur (FD Neurosilver<sup>®</sup> ; FD Neurotechnologies, Ellicott City, États-Unis).

## **IV. Détections immunohistochimiques**

### **IV.1. Sur coupes paraffinées**

Après réhydratation, les coupes ont été incubées 10 min à TA dans un tampon Tris salin (TBS ;  $\text{NaCl}$  0,15 M et Tris-HCl 0,1 M, pH~7,5) contenant 0,3% d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les coupes ont ensuite été incubées 2x15 min dans du TBS-T (TBS contenant 0,05% de Tween 20). Après saturation des sites non spécifiques dans le TBS-TS (TBS-T contenant 1,5% de sérum de chèvre) pendant 1 h à TA, les coupes ont été incubées toute la nuit à +4°C avec l'anticorps primaire dans le TBS-T. Après deux rinçages de 5 min chacun dans du TBS-T, elles ont été

traitées avec l'anticorps secondaire conjugué à la biotine approprié dans le TBS-TS pendant 30 min à TA. Les coupes ont été incubées 30 min à TA en présence du complexe avidine-biotine-péroxydase dilué à 4% dans du TBS-T (kit Vectastain<sup>®</sup> Elite ABC ; Vector Laboratories, Burlingam, États-Unis) puis rincées 2x5 min dans du TBS-T. La révélation a finalement été réalisée par l'incubation des coupes dans une solution de 3',3-DAB (D4293, SigmaFast<sup>®</sup> ; Sigma-Aldrich, Lyon, France) pendant un temps variable suivant les expérimentations (quelques minutes) contenant 0,08% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilué à 30%. La réaction a été stoppée par rinçage dans l'eau distillée et les coupes ont ensuite été déshydratées et montées entre lame et lamelle.

#### **IV.2. Sur coupes flottantes**

Les coupes flottantes ont été incubées avec du PBS-T (PBS 0,1 M, Triton X100 0, 3%) en présence d'1% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilué à 30% pendant 30 min sous agitation et à TA. Les coupes ont ensuite été lavées dans du PBS-T à TA et sous agitation (2 x 10 min). Les sites antigéniques non spécifiques pouvant être reconnus par l'anticorps secondaire ont été saturés par du PBS-TS (PBS-T et sérum de chèvre 1,5%, Vector Laboratories, Burlingam, États-Unis) pendant 60 min sous agitation et à TA. Les coupes ont ensuite été incubées une nuit à 4°C sous agitation, en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS-TS. Le lendemain, les coupes ont été rincées dans du PBS-T (3 x 10 min) et incubées 30 min à TA sous faible agitation en présence de l'anticorps secondaire conjugué à la biotine et dilué dans du PBS-TS. Les coupes ont été rincées abondamment dans du PBS-T et incubées à TA en présence du complexe avidine-biotine-péroxydase (kit Vectastain<sup>®</sup> Elite ABC) dilué à 4% dans du PBS-T. Ce complexe va se fixer aux biotines conjuguées aux anticorps secondaires. Après rinçage dans du PBS-T, la révélation a été réalisée par l'incubation des coupes pendant environ 1 à 2 min dans une solution de DAB (D4293, SigmaFast<sup>®</sup>), contenant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

puis stoppée dans l'eau distillée. Les coupes ont été montées sur des lames gélatinées pour favoriser leur adhérence. La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés ainsi que les conditions d'incubation sont récapitulées dans le Tableau 5.

**Tableau 5. Liste des anticorps utilisés pour les détections immunohistochimiques**

Antigène	Source	Dilution	Procédure	Fournisseur, références
<b>Anticorps primaires</b>				
NeuN	souris	1/400	lames paraffinées	Chemicon ; MAB377
GFAP	lapin	1/5000	lames paraffinées	Dako ; M061
COX-2	lapin	1/200	lames paraffinées	Alexis ; ALX-210-711
ZnT <sub>3</sub>	lapin	1/50-1/10	lames paraffinées	Don généreux du Pr Palmiter, Seattle, États-Unis
Fos	lapin	1/100	coupes flottantes	Santa Cruz ; SC-253
<b>Anticorps secondaires conjugués à la biotine</b>				
Anti-IgG de lapin	chèvre	1/200		Vector ; BA 1000
Anti-IgG de souris	chèvre	1/1000		Vector ; BA 9200

## V. Déshydratation et montage des lames

Après les différentes études histochimiques et immunohistochimiques, les coupes ont été déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante : 70% (3 min), 95% (3 min), 100% (3x3 min) puis de toluène (2x3 min). Les coupes ont ensuite été montées entre lame et lamelle avec de l'histolaque et séchées à l'étuve (37°C).

# ***Dosage des ARNm par RT-qPCR***

## **I. La réaction de transcription inverse**

Les ARNm ont été sélectionnés à l'aide d'une amorce oligodT<sub>15</sub>. Pour la transcription du 18S, des amorces nonamériques (d(N)<sub>9</sub>) ont été utilisées. La réaction de transcription inverse (*reverse transcription*, RT) a été effectuée dans un volume total de 20 µL contenant 1,5 µg d'ARN totaux et un mélange réactionnel comprenant 125U/µL de transcriptase inverse (Euroscript RT<sup>®</sup>, Eurogentec), 2,5 mM de chacun des désoxynucléotides tri-phosphate (dNTP), 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5µM d'oligodT<sub>15</sub> ou de d(N)<sub>9</sub> et 0,4U/µL d'inhibiteur de RNase. Après une incubation de 10 min à 25°C, puis 30 min à 48°C, la transcriptase inverse a été inactivée par la chaleur (5 min à 95°C). Les solutions d'ADN complémentaires (ADNc) obtenues pour chaque échantillon ont été diluées au 1/50 dans l'eau PPI et conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

## **II. Principe de la réaction d'amplification en temps réel**

Les ADNc d'intérêt ont été amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'un thermocycleur (LightCycler<sup>™</sup>, Roche). La réaction de PCR est basée sur la répétition d'un cycle contrôlé par la température comprenant dénaturation des ADN double brin (95°C), l'hybridation des amorces spécifiques (55-59°C) et l'élongation de la séquence nucléotidique d'intérêt grâce à la Taq polymérase (72°C). Le principe du temps réel en PCR repose sur la visualisation du nombre de molécules amplifiées par un fluorochrome spécifique de l'ADN double brin, le SYBR Green<sup>®</sup> dans nos études. La réaction d'amplification est analysée par un logiciel de traitement des données et, dans la phase exponentielle d'amplification, fournit pour chaque échantillon un *cycle de quantification*



(Cq), exprimés en cycles de PCR, inversement proportionnel à la concentration initiale d'ADNc de l'échantillon.

### III. Conception et optimisation des amorces

Les amorces ont été conçues pour recouvrir la frontière exon-intron afin d'empêcher l'amplification d'ADN génomique. La conception des amorces a été effectuée à l'aide du logiciel MacVector<sup>®</sup> (Accelrys, San Diego, États-Unis) pour déterminer leur température de fusion et éviter leur dimérisation ainsi que leur « auto-amorçage ». La spécificité des amorces a été testée par l'algorithme Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) puis synthétisées (Eurogentec, Saraing, Belgique).

Pour chaque gène donné, une optimisation des amorces a été effectuée en utilisant une gamme étalon à partir d'une solution d'ADN recombinant spécifique, diluée en série. L'amplitude utilisée de 4-log doit permettre d'encadrer les concentrations des futurs échantillons. Le coefficient directeur de la droite obtenue à partir de cette gamme étalon permet de connaître l'efficacité (E) de l'amplification :  $E = 10^{(1/\text{pente})}$ . Ainsi, une pente de 3,32 indique une efficacité de PCR de 1 (100 %).

Les amorces ont ensuite été optimisées plus finement en utilisant des dilutions d'un calibrateur expérimental contenant un mélange de tous les échantillons de l'expérimentation. Toutes les optimisations ont été effectuées avec deux duplicats par point de gamme. Enfin, la spécificité de l'amplification a été vérifiée en comparant les courbes de fusion du dernier cycle d'amplification, qui sont spécifiques d'un ADNc donné (Peinnequin et coll., 2004).

#### **IV. Amplification quantitative des ADNc par PCR**

La réaction d'amplification a été effectuée dans un volume final de 20  $\mu\text{L}$  contenant 2,5 à 5  $\mu\text{L}$  de l'ADNc synthétisé (équivalent à 20-40 ng d'ARN totaux), les amorces à une concentration de 400 mM et 15-17,5  $\mu\text{L}$  du LCFAST StartDNAMaster SYBR Green<sup>®</sup> Kit I (Roche). L'ADN recombinant pur a été amplifié à partir d'amorces qui encadrent et dépassent la zone « d'accroche » du couple d'amorces d'intérêt. Le produit amplifié est ensuite dilué afin de constituer la gamme étalon. Avant l'amplification des échantillons, les conditions de PCR ont été optimisées pour chaque ARNm à analyser en faisant varier la température d'hybridation ou la concentration de  $\text{Mg}^{2+}$ . La limite de détection (LD) a été déterminée pour chaque gène en utilisant la gamme étalon de l'ADN recombinant spécifique démontrant une amplification linéaire et correspondant à une efficacité proche de 100 % ; la LD a ainsi été définie comme le Cq de la plus forte dilution des duplicats. L'efficacité de l'amplification (E) a été calculée à partir de la droite étalon des dilutions en série du calibrateur démontrant une amplification linéaire sur 4 magnitudes en utilisant deux duplicats. Les efficacités et les LD ont été consignées dans le Tableau 6.

Tableau 6. Caractéristiques des couples d'amorces utilisés pour l'amplification des ADNc par PCR en temps réel

Gène	séquence 5'-3'	Référence	Position de l'ADNc	Taille de l'amplicon (pb)	Limite de détection (Cq)	Efficacité (%)
<i>Hprt1</i>	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	<a href="#">NM_013556</a>	113-137 235-211	123	29,5	95
<i>Ppia</i>	TATCTGCACTGCCAAGACTGAATG CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	<a href="#">NM_008907</a>	381-404 507-485	127	31,1	96
<i>Tbp</i>	CCGTGAATCTTGGCTGTAAACTTG GTTGTCCGTGGCTCTCTTATTCTC	<a href="#">NM_013684</a>	449-472 566-543	118	26,9	97
<i>Actb</i>	CAGGTCATCACTATTGGCAACGAG CCACAGGATTCATACCCAAGAAG	<a href="#">NM_007393</a>	736-759 818-795	83	33,0	91
<i>Arbp</i>	GAAAATCTCCAGAGGCACCATTG TCCCACCTTGCTCCAGTCTTTATC	<a href="#">NM_007475</a>	509-531 578-554	70	27,6	100
<i>Gapdh</i> (F1-R1)	GTATTGGGCGCCTGGTCACC CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG	<a href="#">NM_008084</a>	78-97 258-279	202	30,3	92
<i>Gapdh</i> (F2-R2)	CCCCTCTCCACCTTCGATG GTCCACCACCTGTTGCTGTAG	<a href="#">NM_008084</a>	913-933 1001-1022	110	29,3	93
<i>18S</i>	GGACCAGAGCGAAAGCATTG GCCAGTCGGCATCGTTTATG	<a href="#">NR_003278</a>	986-1006 1099-1080	114	29,8	99
<i>Gusb</i>	GCAACGCCAAATATGATGCAG GTGGCTGAATCACCTCCAAATG	<a href="#">NM_010368</a>	1448-1468 1558-1537	111	30,1	97
<i>Gfap</i>	GATCGCCACCTACAGGAAATTG CGGATCTGGAGTTGGAGAAAAG	<a href="#">NM_010277</a>	1160-1181 1243-1222	84	28,7	97
<i>IL-1β</i>	GCTGAAAGCTCTCCACCTCAATG GTAACCTCCAC CTCTCGAAAGTCG	<a href="#">NM_008361.3</a>	494-516 582-561	89	32,0	100
<i>IL-1Ra</i>	TTCTCAGAGCGGATGAAGGTAAAG GTAGAGGTCTGAACCGTGTTCGT	<a href="#">NM_031167.5</a>	346-368 459-436	114	30,8	98
<i>cPLA<sub>2</sub></i>	GGACCCAATTGCTTGGTTGTC GAGTAGTAGTGACAGCCTCGACA	<a href="#">NM_008869.3</a>	1458-1480 1556-1535	99	29,5	100
<i>COX-2</i>	AGGCTTCCCAGCTTTTGTAACC CTAATTTGAAGCGTCCTTCCCC	<a href="#">NM_011198</a>	373-394 482-461	110	28,8	100
<i>SOCS3</i>	GAGAGTCCGCTTGTCAAAGGTATTG GTGAACTTCTTCGACCTCGACA	<a href="#">NM_007707.2</a>	1274-1296 1347-1323	74	33,0	97

*Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransférase ; *Ppia*, peptidylprolyl-isomérase-A ; *Tbp*, TATA box binding protein ; *Actb*, actine β ; *Arbp*, phosphoprotéine ribosomale P0 ; *Gapdh*, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; *18S*, ARN 18S ribosomal ; *Gusb*, glucuronidase β ; *Gfap*, protéine acide des gliofilaments ; *IL-1β*, interleukine-1β ; *IL-1Ra*, antagoniste du récepteur à l'interleukine-1 ; *cPLA<sub>2</sub>*, phospholipase-A<sub>2</sub> cytosolique ; *COX-2*, cyclo-oxygénase-2 ; *SOCS3*, protéine suppressive du signal cytokinique 3. Le couple *Gapdh* F1-R1 a été utilisé pour la quantification des gènes cibles alors que le couple F2-R2 a été utilisé pour l'essai d'intégrité 3' : 5' de l'ARN (voir page 183). La limite de détection a été déterminée, à partir de dilutions en série du calibrateur d'expérimentation ayant démontré une amplification linéaire, comme le cycle de quantification (Cq) des étalons les plus dilués. Abréviations : Pb, paires de bases ; Cq, cycle de quantification.

Après amplification, les Cq ont été calculés par le logiciel LightCycler<sup>TM</sup> v.3.5 (Roche) par la méthode du maximum de la dérivée seconde, aucune valeur n'étant en dessous de la LD pour les gènes testés. La quantification relative de l'ADNc présent dans chaque échantillon, correspondant à la *valeur brute* (avant normalisation) a été effectuée par rapport au calibrateur de chaque structure analysée par la méthode de comparaison des Cq (Livak et Schmittgen, 2001).

## **V. Normalisation des données**

### **V.1. Préambule**

Il existe différentes stratégies pour minimiser les variations expérimentales liées aux expérimentations de RT-qPCR, chacune avec ses avantages et ses inconvénients (Huggett et coll., 2005). La plupart ne peuvent cependant pas réduire complètement les sources de variation. Des molécules artificielles peuvent être ajoutées dans l'échantillon avant l'extraction ou avant l'étape de RT (Gilsbach et coll., 2006) (Huggett et coll., 2005). Cela permet de donner une indication de l'efficacité de la RT et de la procédure de qPCR, et permet de révéler une inhibition. Cependant, le concept de gène de référence est la voie majoritaire afin de normaliser les données de qPCR. Ce concept est particulièrement attractif parce que les gènes de référence sont des contrôles internes affectés par toutes les sources de variation durant le processus expérimental, comme les gènes d'intérêts analysés. Les gènes de référence sont exprimés dans les cellules et leur ARNm sont présents durant le prélèvement du tissu biologique, l'extraction, la conservation ainsi que durant tous les processus enzymatiques infligés. Ainsi, les gènes de références ont la capacité intrinsèque de capter toutes les variations non biologiques et constituent ainsi d'excellents contrôles internes. Cependant, un problème majeur est la preuve documentée dans la littérature de leur régulation dans certaines circonstances. Il est ainsi d'extrême importance de valider les gènes

référents dans chaque condition expérimentale. De plus, ce type de variation passe souvent inaperçu parce que la plupart des expérimentations incluent un seul gène de référence.

Il n'existe pas de méthode recommandée à ce jour, mais chaque expérimentation de RT-qPCR doit faire appel à une validation de son ou ses gène(s) de référence.

## **V.2. Protocole utilisé**

Les valeurs brutes ont été normalisées par la combinaison la plus stable déterminée par l'analyse *geNorm* dans nos conditions expérimentale en utilisant la méthode  $E^{-\Delta\Delta Cq}$  (Schmittgen et Livak, 2008).

L'équipe de Vandesompele (Vandesompele et coll., 2002) a été la première à quantifier les erreurs associés à l'utilisation d'un seul gène de référence non validé, et à développer une méthode permettant la sélection des gènes de référence les plus stables, ainsi qu'à proposer l'utilisation de plusieurs gènes de référence pour le calcul d'un facteur de normalisation approprié. Le principe majeur est que le rapport d'expression de deux gènes stables devrait être constant à travers les échantillons. Pour chaque gène de référence, une valeur de stabilité  $M$  est ainsi définie comme la moyenne des variations d'un gène particulier par rapport à tous les autres gènes candidats testés. Afin d'alléger les calculs, les auteurs ont constitués une *Visual Basic Application* pour Excel appelé *geNorm* qui calcule automatiquement les valeurs de stabilité pour chacun des gènes testés pour les échantillons. Le logiciel emploie un algorithme permettant de classer les gènes de référence potentiels par l'intermédiaire de leur stabilité d'expression par un processus répété d'exclusion du plus mauvais. Enfin, les auteurs ont défini une stratégie permettant de déterminer le nombre minimal de gènes de référence pour une normalisation correcte, par une analyse de variance des facteurs de normalisation calculés pour l'ajout d'un nouveau gène de référence.

## *Matériels et méthodes spécifiques à l'étude du soman*

### **I. Injection du soman sous anesthésie légère**

Cette procédure a été effectuée afin de déterminer les modifications électrophysiologiques précoces faisant suite à l'injection intrahippocampique de soman (Section B, page 67). Les animaux ont été anesthésiés à l'hydrate de chloral et implantés avec un guide canule en acier (24 G, diamètre externe de 0,56 mm, longueur ~1,5 cm, Phymep) au-dessus de l'hippocampe dorsal droit selon les coordonnées stéréotaxiques : AP, -2 mm ; ML, -1,5 mm ; DV, -0,5 mm en référence au bregma (Paxinos et Franklin, 2001), et selon les mêmes procédures chirurgicales présentées page 165. Ces animaux étant destinés à une étude électro-encéphalographique, une implantation d'électrodes a également été effectuée selon la procédure décrite page 168. Après récupération totale des animaux (7 j), l'injection intrahippocampique de soman a été effectuée sous anesthésie légère grâce à l'halothane. L'induction anesthésique a été réalisée dans une cage d'induction avec un débit d'oxygène pur de 3 L/min traversant la cuve d'évaporation. L'anesthésie a été ensuite entretenue lors de la procédure d'injection, à l'aide d'un masque adapté, avec un débit d'environ 2 L/min. L'injection intrahippocampique de la solution d'étude (soman ou sérum physiologique, voir page 67) a été effectuée à l'aide d'une canule dépassant d'1,5 mm le guide canule afin d'atteindre l'hippocampe dorsal droit. L'ensemble de cette procédure a permis une récupération rapide des animaux suite à l'injection (voir Section B, page 85) et ainsi l'observation d'événements EEG et cliniques précoces sans perturbations trop importantes liées à l'usage d'un anesthésique.

## II. Protection périphérique face aux effets du soman

L'injection intrahippocampique de la plus forte dose utilisée dans nos expérimentations (11 nmol) a induit des effets cholinergiques périphériques nets (voir page 75), nécessitant un traitement préventif pour réduire la mortalité, mais n'empêchant pas l'action du soman au sein du SNC. Cette protection a été fournie par le nitrate de méthylatropine (NMA), un antagoniste muscarinique ne franchissant pas la BHE. Une solution à 0,06 % de NMA (Sigma-Aldrich, Lyon, France) a été constituée dans du sérum physiologique (30 mg/50 mL) et conservée à 4°C. La protection a consisté en l'injection ip de cette solution à une dose de 4 mg/kg. La protection optimale (période et nombre d'injections) a fait l'objet d'une étude particulière (Section B, page 75).

## III. Prélèvements sanguins et dosage des cholinestérases

Afin de déceler les effets périphériques provoqués par la micro-injection intrahippocampique de soman, l'activité des ChE a été déterminée dans le sang total prélevé au niveau du sinus rétro-orbitaire pendant la période d'anesthésie générale des animaux. Le prélèvement sous-mandibulaire au moyen d'un nouveau système (Goldenrod Animal Lancet<sup>®</sup>; Bioseb, Paris, France) s'est révélé peu fiable. Le prélèvement sanguin a été réalisé à l'aide de capillaires pour hématocrite héparinés (volume de 60  $\mu$ L ; longueur de 75 mm et diamètre de 1,3-1,4 mm ; VWR, Val de Fontenay, France). Le sang prélevé a été placé dans un tube Eppendorf contenant 3  $\mu$ L d'héparine (5000 UI/mL, Héparine Choay, Sanofi), dilué au 1/10 dans de l'eau PPI pour hémolyser le prélèvement, puis congelé à -80°C jusqu'à son utilisation.

L'activité enzymatique des ChE a été déterminée par spectrophotométrie d'absorption à 412 nm, à l'aide d'une méthode de dosage adaptée de celle d'Ellman (Ellman et coll., 1961).

Le dosage a été effectué à 25°C dans un volume total de 3 mL constitué par 2750 µL de PBS (pH~7), 100 µL de prise d'essai (sang dilué au 1/10), 50 µL d'une solution d'iodure d'acétylthiocholine (Sigma-Aldrich, Lyon, France) à 0,06 M dans du sérum physiologique et 100 µL d'une solution d'acide 5,5-dithio-2bis-nitrobenzoïque à 10 mM dans le PBS. Le blanc a été constitué par ce même mélange dénué d'AChSH, dans un volume identique (3 mL).

#### **IV. Etudes comportementales**

A l'exception de l'activité locomotrice et de la mémoire spatiale, les études comportementales ont été effectuées dans un autre institut (IRBA-IMASSA ou Université de Bordeaux), à distance du lieu où les souris recevaient la micro-injection (IRBA-CRSSA). Les souris ont donc eu 20-30 jours d'acclimatation au nouvel environnement avant l'initiation des tests comportementaux.

##### **IV.1. Activité locomotrice**

L'activité locomotrice forcée a été évaluée à l'aide d'un rotarod (Panlab SL) muni d'une barre rotative de 3 cm de diamètre (Figure 48A). L'appareil était élevé à 20 cm au-dessus du sol et une accélération constante de 1 rotation par min (rpm) toutes les trois secondes a été appliquée afin d'augmenter la vitesse de rotation de 4 à 40 rpm en 2 min. La chute d'un animal est détectée automatiquement et la vitesse atteinte par le cylindre à cet instant est affichée. Pour chaque temps d'étude, chaque animal a été sujet à deux essais et la vitesse maximale a été conservée. Pour chacun des groupes expérimentaux, la valeur moyenne a été calculée à partir des valeurs individuelles.



## **IV.2. Mémoire spatiale**

### ***IV.2.1.Appareillage***

La mémoire spatiale de référence a été évaluée au moyen du test de la piscine de Morris (Figure 48B). Une piscine circulaire (diamètre de 140 cm ; profondeur de 45 cm) a été remplie d'eau rendue opaque à une température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , et jusqu'à une hauteur de 25 cm. Une plateforme (plot de Plexiglas de 11 cm de diamètre) a été rendue invisible par son placement 2 cm sous la surface de l'eau. Le comportement des souris a été suivi au moyen d'une caméra et visualisé à l'aide du logiciel VidéoTrack<sup>®</sup> (*ViewPoint*, Lyon, France).

### ***IV.2.2.Procédure***

L'expérimentation a consisté en la réalisation d'une séance quotidienne, pendant une durée totale de cinq jours, pendant laquelle les animaux ont été placés dans la piscine, à partir de chacun des quatre points de départ possibles, à la recherche de la plateforme. Les animaux qui ont trouvé la plateforme y ont été laissés 15 s. Un animal incapable de trouver la plateforme pendant le temps imparti (60 s) a été placé manuellement dessus. Pour chaque animal, les paramètres obtenus à partir des quatre points de départ ont été moyennés pour donner la performance du jour. Après avoir réalisé le dernier test du cinquième jour, les animaux ont réalisé un test de mémorisation spatiale.

## **IV.3. Mémoire de travail**

### ***IV.3.1.Appareillage***

La performance de la mémoire de travail a été évaluée au moyen d'un labyrinthe en T, constitué d'une allée centrale et de deux bras d'arrivée (Figure 48C). L'entrée et les bras mesurent 44 cm de long, 8 cm de large et sont hauts de 20 cm. La zone de départ a été

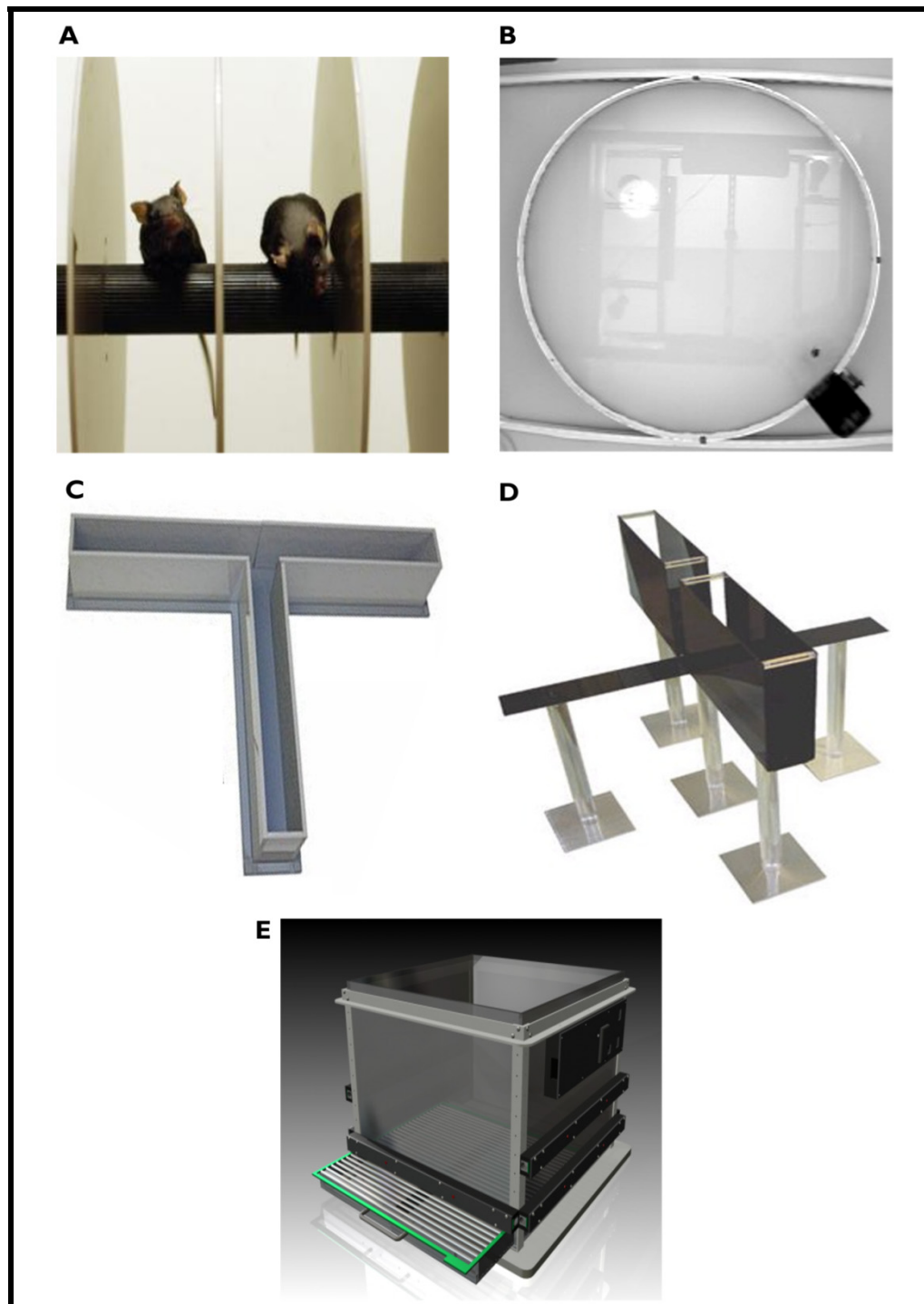
séparée de l'entrée du labyrinthe par une porte verticale coulissante. Des portes coulissantes verticales ont également été placées à l'orée de chaque bras. Le labyrinthe a été uniformément éclairé au moyen d'une lumière de faible intensité (10 lux).

#### ***IV.3.2.Procédure***

Pendant 10 jours avant le test proprement dit, les animaux ont été manipulés quotidiennement pendant 5 min afin de limiter les interférences dues à la manipulation. Afin de se familiariser avec l'appareil les souris ont subies deux séances de 12 min chacune d'exploration libre du dispositif, et séparées de 24 h. Elles ont ensuite réalisées trois sessions de 6 essais, séparées de 24 h chacune. Les deux premières sessions (J1 et J2) ont permis aux souris de se familiariser aux conditions du test et notamment avec l'ouverture et la fermeture des portes, tandis que la troisième session (J3) a constitué le test proprement dit. Chaque session a débuté par le positionnement de la souris dans la zone de départ durant 60 s avant que la porte donnant accès au labyrinthe ne soit ouverte. Dès que l'animal a pénétré dans un des deux bras, la porte qui y donne accès a été fermée et l'animal a été maintenu dans ce bras pendant 30 s. L'animal a ensuite été repositionné sur la zone de départ pour une nouvelle session. Une réponse alternée est prise en compte si l'animal a pénétré dans le bras opposé à celui de la session précédente. Seuls les animaux ayant réussi la première alternance ont été pris en compte pour l'analyse statistique, ce qui permet de s'assurer que la motricité et la motivation à alterner sont identiques chez tous les individus. Pour éviter toute contamination olfactive, le labyrinthe a été nettoyé à l'aide d'alcool à 70° et séché entre chaque animal.

Les animaux n'ayant pas réussi le test de première alternance (3/15 pour le groupe soman et 4/15 pour le groupe TEM) ont été retirés de l'étude. La mémoire de travail a été évaluée par l'expression du taux d'alternance exprimé en pourcentage du taux maximal de 100.

Figure 48. Illustration des appareillages utilisés lors des études comportementales



La coordination motrice et la mémoire spatiale ont été analysées avec un *rotarod* (A) et un labyrinthe de Morris (B), respectivement. Le comportement d'alternance spontanée et l'anxiété ont été évalués à l'aide du labyrinthe en T (C) et du labyrinthe en croix surélevé (D), respectivement. (E), appareillage utilisé pour évaluer la réponse émotionnelle conditionnée chez le rongeur.

## **IV.4.      Anxiété**

### ***IV.4.1.Appareillage***

L'appareillage utilisé au laboratoire de l'IMASSA est basé sur les spécifications décrites par Lister (Lister, 1987) avec quelques modifications. Il est fabriqué en polychlorure de vinyle et est constitué de deux bras opposés ouverts (30 cm x 6 cm) qui croisent en angle droit avec deux bras opposés fermés de mêmes dimensions munis de parois verticales noires et opaques de 25 cm de haut (Figure 48D). Les bras s'étendent depuis une plateforme centrale (7 cm x 7 cm). L'ensemble du labyrinthe est élevé à une hauteur de 50 cm au-dessus du sol et un bord fin (0,5 cm) autour du périmètre des bras ouverts permet l'agrippement des animaux, et évite leur chute. Le dispositif est éclairé avec une intensité de 60 lux.

### ***IV.4.2.Procédure***

Les expérimentations ont débuté 4 jours après l'expérimentation du labyrinthe en T. L'étude a été réalisée en aveugle, l'expérimentateur n'ayant pas eu connaissance *a priori* de la répartition des souris dans les deux groupes. Trente animaux ont été reçus à l'IMASSA (15 souris TEM et 15 souris soman) et maintenus en cages individuelles pendant toute la durée de l'étude. Elles ont été habituées à la manipulation pendant 2 semaines avant le début des tests.

Les souris ont été placées sur la plateforme centrale du dispositif, de telle façon qu'elles puissent voir les deux entrées du bras fermé et l'autre entrée du bras ouvert. Elles ont été ensuite laissées libres d'explorer le dispositif pendant 5 min. Le critère d'entrée dans un bras est le fait que l'animal ait franchi la zone centrale et que ses 4 pattes se trouvent effectivement dans le bras.

## **IV.5. Réponse émotionnelle conditionnée**

### ***IV.5.1.Appareillage***

La réponse émotionnelle conditionnée (REC) a été déterminée dans une chambre (45x 30 x 25 cm de haut) en Plexiglas gris (voir exemple Figure 48E). Le plancher de la chambre est constitué de 72 barreaux en acier inoxydable (3 mm de diamètre) espacés de 5 mm et connectés à un générateur de choc électrique (stimulus non conditionnant, *unconditioned stimulus*, US). Un haut parleur connecté à un générateur de son est placé dans la paroi de la chambre et permet l'émission du stimulus de conditionnement (*conditioned stimulus*, CS). L'animal a été observé à l'aide d'une caméra et d'un logiciel vidéo permettant de mesurer le temps passé en état d'immobilité (réponse émotionnelle conditionnée, REC). Une seconde chambre avec des murs blancs et un plancher opaque en Plexiglas, de même dimension que la cage de conditionnement, a été utilisée comme contexte neutre pour la réponse au son (chambre neutre). Le bruit de base et la lumière (20 lux) ont été maintenus constants dans la pièce d'expérimentation.

### ***IV.5.2.Procédure***

La procédure est basée sur des expérimentations antérieures (Celerier et coll., 2000). Trois jours avant le début du conditionnement, les animaux ont été manipulés quotidiennement afin de les habituer à l'expérimentateur. Le jour du conditionnement, les animaux sont placés dans la chambre de conditionnement pendant 4 min. Pendant les deux premières minutes, on mesure l'immobilité naturelle de l'animal (immobilité préCS-US). Après ces 2 min, le stimulus de conditionnement auditif (CS ; 1000 Hz, 60 dB) est délivré pendant 5 s et terminé au moment où un choc électrique est délivré (US ; 0,9 mA pendant 2 s). Les animaux restent dans la chambre de conditionnement pendant 115 s après la fin du choc. L'immobilité est mesurée après la phase ayant associée le son et le choc électrique (CS-US). Un jour plus tard,

la REC contextuelle a été évaluée en replaçant l'animal dans la cage de conditionnement pendant 4 min. La REC auditive a été observée le même jour, 4 h plus tard, en replaçant l'animal dans la chambre neutre pendant 4 min et en faisant émettre le son pendant les deux dernières minutes. L'immobilité est mesurée durant les 4 min du test, c'est-à-dire pendant les 2 min précédant le son (phase préCS) et durant les 2 min restantes (phase CS). La différence entre ces deux périodes a été utilisée comme index de l'effet du conditionnement auditif.

## **V. Analyse morphologique des neurones par la méthode de Golgi**

La méthode d'imprégnation argentique dite de Golgi est une des techniques les plus efficaces pour l'étude de la morphologie des neurones. Nous avons utilisé un kit commercial (FD Rapid GolgiStain™ Kit ; FD Neurotechnologies, Ellicott City, États-Unis) qui se base sur une technique précédemment décrite (Gibb et Kolb, 1998).

Les souris ont été sacrifiées par décapitation et les cerveaux immédiatement extraits de la boîte crânienne. Les cerveaux ont ensuite été rincés à l'eau distillée puis immergés pendant 2 semaines à TA dans une solution d'imprégnation. Les cerveaux ont ensuite été rapidement congelés à l'isopentane (~-40°C pendant 1 min) et des coupes de la région hippocampique d'épaisseur ~100 µm ont été recueillies au moyen d'un cryostat (Leica) sur lame gélatinées. Les sections ont ensuite été traitées en suivant les recommandations du fournisseur.

## VI. Détection des cholinestérases sur coupes de cerveau frais congelé

La diffusion du soman dans le SNC de l'animal a été évaluée par une détection histochimique des ChE sur coupes selon une adaptation de la méthodologie publiée par Kobayashi et coll. (Kobayashi et coll., 1994). En présence d'ions cuivriques et ferricyanures, l'AChE forme à partir d'acétylthiocholine (AChSH) un précipité insoluble de thiocholine cuivrique aux sites de localisation de l'enzyme. Cette réaction a été intensifiée par incubation avec la 3'-3-diaminobenzidine (DAB ; D-4293 SigmaFast<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, Lyon, France) et oxydation en un produit brun.

Les souris ont été sacrifiées par décapitation et les cerveaux immédiatement extraits de la boîte crânienne, plongés dans l'isopentane à -40°C pendant 1 min et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Des coupes sagittales de la région hippocampique, d'épaisseur 14 µm, couvrant une distance interaurale de 0 mm (ligne médio-sagittale) à +3 mm (extension ipsilatérale) et frontales (~-1 mm à -3 mm, à partir du bregma selon l'axe rostro-caudal) (Paxinos et Franklin, 2001) ont été recueillies au moyen d'un cryostat (Leica) sur lame Superfrost (Menzel-Gläser, Braunschweig, Allemagne). Les coupes ont ensuite été fixées par une solution de formaldéhyde 4 % (10 % de formaldéhyde et 90 % d'une solution d'acétate de calcium à 0,1 M) pendant 15 min puis rincées à l'eau claire. Les sections ont alors été incubées pendant 15 min dans une solution extemporanée (150 mL) constituée d'un mélange d'iodure d'acétylthiocholine (75 mg, Sigma-Aldrich, Lyon, France), d'eau distillé (15 mL), de sulfate de cuivre 30 mM (CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O ; 15 mL, Merck Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France), de citrate de sodium 0,1 M (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, 2 H<sub>2</sub>O ; 7,5 mL, Merck Chemicals), de tampon acétate 0,1 M pH 6 (97,5 mL, Sigma-Aldrich, Lyon, France) et de ferricyanure de

potassium 5 mM (15 mL, Sigma-Aldrich, Lyon, France). Les coupes ont été rincées à l'eau claire puis révélées par la DAB à TA pendant 2 min.

## ***Matériels et méthodes spécifiques à l'étude du kaïnate***

Deux types de modulateurs inflammatoires ont été sélectionnés pour nos expérimentations, un agent anti-inflammatoire dont le mode d'action est caractérisé par l'inhibition des COX-2, le *celecoxib*, et un agent inducteur inflammatoire, le *lipopolysaccharide bactérien* (LPS).

### **I. Celecoxib**

Le celecoxib est un anti-inflammatoire non stéroïdien qui inhibe sélectivement la COX-2. Son mécanisme d'action passe par la suppression de la production de prostaglandines au niveau des sites inflammatoires. La dose et le délai d'injection de celecoxib a été déterminée à 10 mg/ kg (ip) en référence aux travaux de Gobbo et coll. (2004). Le celoxib (LKT-C1644-G001 ; Covalab, Villeurbanne, France) est présent sous forme de cristaux inodores et blancs. Sa solubilité dans l'eau est extrêmement faible (5 µg/mL à pH 9 et 0,8 mg/mL à pH 12) ; elle est augmentée dans les solutions alcooliques ainsi que dans le DMSO. Afin d'éviter l'injection d'une solution alcoolique chez la souris, nous avons choisi de solubiliser le celecoxib dans le DMSO. Nos différents essais montrent qu'une solution de DMSO à 100 % peut solubiliser 48 mg/mL de celecoxib. En revanche, une solution de DMSO à 50 % ne permet pas la dissolution de celecoxib à une concentration de 19 mg/mL. L'injection de celecoxib a donc été effectuée dans le DMSO pur (100 %) comme dans d'autres travaux (Lada-Moldovan et coll., 2009; Sharifzadeh et coll., 2005). Une solution mère à 5 mg/mL a



été effectuée et conservée à TA. L'injection de 10 mg/kg (ip) a été réalisée dans un volume de 50  $\mu$ L.

## II. Lipopolysaccharide bactérien

L'administration de LPS modifie l'excitabilité neuronale (Sayyah et coll., 2003; Wang et White, 1999). Cette dernière expérimentation a démontré que l'administration de LPS (1 mg/kg, ip) diminuait le seuil de déclenchement des crises induites par le PTZ chez la souris. L'action proconvulsivante débutait 30 min après l'injection et perdurait jusqu'à 12 h.

Nous avons privilégié la voie systémique (ip) en raison de sa description exhaustive dans la littérature. De plus, l'administration intratissulaire au sein du SNC induit une dégénérescence voire une mort neuronale pouvant perturber l'interprétation histologique (Liu et coll., 2000c). Nous avons choisi le LPS issu d'*Escherichia Coli*. En effet, à des doses similaires (1 mg/kg), le LPS issu de *Shigella flexneri* n'a pas modifié le seuil de déclenchement des crises par le PTZ contrairement à celui issu d'*E. Coli* (Yuhás et coll., 2002 ; Yuhás et coll., 1995). Les données de la littérature semblent indiquer des effets comparables suite à la délivrance de différents sérotypes de LPS issus d'*E. Coli*. Ainsi, afin d'étudier le rôle de l'activation neuro-inflammatoire dans l'épileptogénèse induit par micro-injection de KA chez la souris, nous avons choisi de nous placer dans les mêmes conditions que l'étude de (Sayyah et coll., 2003) à savoir l'injection ip de LPS issu d'*E. Coli* à la dose d'1 mg/kg, 1 h avant l'injection de KA.

Le LPS (*E. Coli* sérotype 026:B6; Sigma-Aldrich, Lyon, France) a été dissous dans le sérum physiologique (10 mg/mL) et conservé en aliquotes de 50  $\mu$ L à -20°C. Le jour de l'expérimentation, un volume approprié de sérum physiologique a été ajouté afin d'obtenir la concentration désirée. Une étude préliminaire avec la dose de 1 mg/kg (ip) a démontré une surmortalité des animaux dans les 24 h suivant l'injection intrahippocampique de KA

(2 décès sur sur 3 animaux injectés) ; nous avons dès lors choisi de réduire la dose de LPS à 0,8 mg/kg (ip) qui s'est révélée sans retentissement sur la mortalité des animaux (page 124).

## ***Analyse et traitement statistique des données***

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide des logiciels Statistica<sup>®</sup> 5.1 (*StatSoft*, Paris, France), Statview<sup>®</sup> 5.0 (*Abacus Concept*, Berkeley, Etats-Unis) ou StatXact-8<sup>®</sup> (*Cytel*, Cambridge, Etats-Unis). Le seuil de signification statistique a été choisi égal à 5 %.

### **I. Dosage des cholinestérases sanguines**

Le sang a été échantillonné 30 min avant pour déterminer l'activité basale, et 1 h après l'injection intrahippocampique de soman. L'activité des ChE dans le sang total a donc été exprimée en pourcentage de l'activité basale (Figure 17).

### **II. Études comportementales**

Pour le rotarod, la piscine de Morris, le labyrinthe en T et le labyrinthe en croix surélevé, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur suivi par un test de Newman-Keuls ont été utilisés pour examiner la performance d'acquisition des tests en fonction du traitement.

Les données de REC ont été analysées par une ANOVA à deux facteurs suivie par un test post-hoc de Scheffé. Les comparaisons intragroupes ont été effectuées par un test *t* de Student.

### **III. Études EEG**

Les artefacts induits par les mouvements de l'animal (ondes très lentes associées à une amplitude saturante) ont été écartés. Différents types de signaux EEG pathologiques ont été

observés durant l'analyse, comme des pointes isolées, des bouffées de pointes ou des décharges paroxystiques de grande amplitude. Notamment, et afin de caractériser l'activité EEG, les décharges paroxystiques observées ont été définies comme des crises EEG lorsqu'elles duraient plus de 9-10 s. L'épileptogénèse a ainsi été caractérisée par la présence de crises dont les caractéristiques de durée et de fréquence ont été calculées pour chaque animal (Expérimentation I et II, Tableau 2 et Figure 37).

Pour l'analyse statistique des caractéristiques de l'épileptogénèse suite à l'injection intrahippocampique de soman (Tableau 2), à chaque temps d'étude, une comparaison du nombre d'animaux présentant des crises avec les différentes doses testées au-dessus de 0,75 nmol a été effectuée par un test de Fisher-Freeman-Halton. La fréquence et la durée des crises n'ont pas été comparées en raison de la taille limitée des groupes. Pour les variations EEG initiales (Section B, Expérimentation II, page 85), l'aire sous la courbe (ASC) a été calculée à l'aide du logiciel SigmaPlot v.11.0 (Systat Software, Chicago, Etats-Unis) pour chaque animal sur différentes fenêtres temporelles en fonction de la durée des effets. Pour le pourcentage de puissance totale pré-injection (Figure 21) et la bande  $\theta$ , l'ASC a été calculée sur la durée totale de l'expérimentation (24 h post-injection). Pour, La fenêtre temporelle a été déterminée à 6 h et 9 h post-injection pour la bande  $\delta$  et  $\alpha$ , respectivement. Pour la bande  $\beta$  et  $\gamma$ , où des variations transitoires ont été mises en évidence, la fenêtre temporelle a été réduite à 4 h post-injection. La comparaison statistique des ASC a été effectuée par l'utilisation d'un test d'analyse de variance (ANOVA) de Kruskal-Wallis suivi par le test post-hoc proposé par le logiciel Statistica<sup>®</sup>.

#### **IV. Études histologiques**

Les coupes ont été observées préalablement au microscope de laboratoire (Leica). Les photomicrographies ont été acquises à l'aide d'un microscope Zeiss AxioPlan 2 (Carl Zeiss,

Göttingen, Germany) à l'aide des filtres et objectifs appropriés à l'étude. Les images ont été capturées à l'aide du logiciel d'acquisition AxioVision (Carl Zeiss).

Une analyse quantitative a été effectuée 21 j après l'injection de KA et après analyse EEG. Pour quantifier la perte cellulaire, et pour chaque hippocampe, trois sections consécutives colorées à l'H&P ont été analysées. Pour la zone CA1, la perte cellulaire a été présentée comme la moyenne du rapport de la longueur de lésion sur la longueur totale. Pour la zone CA3 et le hile, les cellules en souffrance ont été comptées manuellement. Comme présenté Figure 38, nous avons utilisé le rapport entre l'hippocampe ipsilatéral et controlatéral afin de prendre en compte les variations de l'intensité du marquage. La dispersion des cellules granulaires du GD a été déterminée de même sur trois sections consécutives colorées à l'H&P. Trois mesures d'épaisseur de la couche granulaire ont été effectuées sur chaque section à la fois du côté ipsi- et controlatéral. La quantification a été basée sur neuf mesures pour chaque animal. L'analyse statistique a été effectuée par un test non paramétrique de *Mann-Whitney*.

L'inhibition des ChE, donnant lieu à un blanchiment massif des coupes (Figure 24), a été évaluée visuellement sur des sections séparées de 250  $\mu\text{m}$ . Les photomicrographies associées ont été effectuées à l'aide d'un appareil photographique adapté et traitées numériquement.

## V. Dosage des ARNm par RT-qPCR

La quantité d'ARNm des gènes cibles a été normalisée par le rapport de gènes de référence après validation (voir Expérimentation III). Pour quantifier l'expression de chaque gène chez les animaux intoxiqués par rapport aux animaux témoins (TEM), nous avons tout d'abord calculé la moyenne des  $\Delta\text{Cq}$  obtenus avec les animaux TEM, à temps d'étude et structure fixées ( $\Delta\text{Cq}_{\text{mTEM}}$ ). Ensuite, pour chaque animal injecté avec le traitement, nous avons calculé le rapport entre  $2^{-\Delta\text{Cq}}$  and  $2^{-\Delta\text{Cq}_{\text{mTEM}}}$ , qui permet l'estimation de la variation

d'expression d'un gène donné par rapport aux animaux TEM (Livak et Schmittgen, 2001; Schmittgen et Livak, 2008). Les données ont été représentées par la moyenne  $\pm$  ES. L'analyse statistique a été effectuée par un test non paramétrique de Mann-Whitney.

## Bibliographie

Akaike, A., Takada-Takatori, Y., Kume, T., and Izumi, Y. (2009). Mechanisms of Neuroprotective Effects of Nicotine and Acetylcholinesterase Inhibitors: Role of  $\alpha 4$  and  $\alpha 7$  Receptors in Neuroprotection. *Journal of Molecular Neuroscience*.

Akiba, S., and Sato, T. (2004). Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27, 1174-1178.

Allan, S.M., Tyrrell, P.J., and Rothwell, N.J. (2005). Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature Reviews. Immunology* 5, 629-640.

Anagnostaras, S.G., Maren, S., and Fanselow, M.S. (1995). Scopolamine selectively disrupts the acquisition of contextual fear conditioning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 64, 191-194.

Andersen, C.L., Jensen, J.L., and Orntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 64, 5245-5250.

Amaral, D., and Lavenex, P. (2007). Neuroanatomy of the rat hippocampal formation. In *The hippocampus book*, P. Andersen, R.Morris, D.Amaral, T. Bliss and J.O'Keefe, eds. (New-York, NY, U.S.A.: Oxford University Press).

Apland, J.P., Aroniadou-Anderjaska, V., and Braga, M.F. (2009). Soman induces ictogenesis in the amygdala and interictal activity in the hippocampus that are blocked by a GluR5 kainate receptor antagonist in vitro. *Neuroscience* 159, 380-389.

Araque, A., Martin, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., and Buno, W. (2002). Synaptically released acetylcholine evokes  $Ca^{2+}$  elevations in astrocytes in hippocampal slices. *Journal of Neuroscience* 22, 2443-2450.

Arenander, A., and de Vellis, J. (1992). Early response gene induction in astrocytes as a mechanism for encoding and integrating neuronal signals. *Progress in Brain Research* 94, 177-188.

Aroniadou-Anderjaska, V., Figueiredo, T.H., Apland, J.P., Qashu, F., and Braga, M.F. (2009). Primary brain targets of nerve agents: The role of the amygdala in comparison to the hippocampus. *Neurotoxicology* 30, 772-776.

Baik, E.J., Kim, E.J., Lee, S.H., and Moon, C.H. (1999). Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. *Brain Research* 843, 118-129.

Baille-Le Crom, V., Collombet, J.M., Carpentier, P., Brochier, G., Burckhart, M.F., Foquin, A., Pernot-Marino, I., Rondouin, G., and Lallement, G. (1995). Early regional changes of GFAP mRNA in rat hippocampus and dentate gyrus during soman-induced seizures. *Neuroreport* 7, 365-369.

Baille Le Crom, V., Collombet, J.M., Burckhart, M.F., Foquin, A., Pernot Marino, I., Rondouin, G., and Lallement, G. (1996). Time course and regional expression of C-FOS and HSP70 in hippocampus and piriform cortex following soman-induced seizures. *Journal of Neuroscience Research* 45, 513-524.

Baille, V., Clarke, P.G.H., Brochier, G., Dorandeu, F., Verna, J.M., Four, E., Lallement, G., and Carpentier, P. (2005). Soman-induced convulsions: the neuropathology revisited. *Toxicology* 215, 1-24.

Bajgar, J., Sevelova, L., Krejcova, G., Fusek, J., Vachek, J., Kassa, J., Herink, J., de Jong, L.P., and Benschop, H. (2004). Biochemical effects of low level exposure to soman vapour. *Central European Journal of Public Health* 12 Suppl, S4-7.

Baker, W.W., and Benedict, F. (1968). Analysis of local discharges induced by intrahippocampal microinjection of carbachol or diisopropylfluorophosphate (DFP). *International Journal of Neuropharmacology* 7, 135-147.

Barres, B.A., and Barde, Y. (2000). Neuronal and glial cell biology. *Current Opinion in Neurobiology* 10, 642-648.

- Bartolomei, F., Chauvel, P., and Wendling, F. (2005). [Spatio-temporal dynamics of neuronal networks in partial epilepsy]. *Revue Neurologique* 161, 767-780.
- Basu, A., Krady, J.K., and Levison, S.W. (2004). Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *Journal of Neuroscience Research* 78, 151-156.
- Bauer, S., Cepok, S., Todorova-Rudolph, A., Nowak, M., Koller, M., Lorenz, R., Oertel, W.H., Rosenow, F., Hemmer, B., and Hamer, H.M. (2009). Etiology and site of temporal lobe epilepsy influence postictal cytokine release. *Epilepsy Research* 86, 82-88.
- Bazan, N.G., Colangelo, V., and Lukiw, W.J. (2002). Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 68-69, 197-210.
- Behrends, J.C., and Ten-Bruggencate, G. (1993). Cholinergic modulation of synaptic inhibition in the guinea pig hippocampus in vitro: excitation of GABAergic interneurons and inhibition of GABA-release. *Journal of Neurophysiology* 69, 626-629.
- Bekenstein, J.W., and Lothman, E.W. (1993). Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. *Science* 259, 97-100.
- Belluardo, N., Mudo, G., Blum, M., and Fuxe, K. (2000). Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behavioural Brain Research* 113, 21-34.
- Ben-Ari, Y., and Cossart, R. (2000). Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends in Neurosciences* 23, 580-587.
- Benton, R.L., Maddie, M.A., Minnillo, D.R., Hagg, T., and Whittemore, S.R. (2008). *Griffonia simplicifolia* isolectin B4 identifies a specific subpopulation of angiogenic blood vessels following contusive spinal cord injury in the adult mouse. *Journal of Comparative Neurology* 507, 1031-1052.
- Benveniste, E.N. (1997). Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chemical Immunology* 69, 31-75.
- Bernard, C., Esclapez, M., Hirsch, J.C., and Ben-Ari, Y. (1998). Interneurons are not so dormant in temporal lobe epilepsy: a critical reappraisal of the dormant basket cell hypothesis. *Epilepsy Research* 32, 93-103.
- Bernard, V., Brana, C., Liste, I., Lockridge, O., and Bloch, B. (2003). Dramatic depletion of cell surface m2 muscarinic receptor due to limited delivery from intracytoplasmic stores in neurons of acetylcholinesterase-deficient mice. *Molecular and Cellular Neurosciences* 23, 121-133.
- Bertram, E. (2007). The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia* 48 Suppl 2, 65-74.
- Bickel, U., Grave, B., Kang, Y.S., del Rey, A., and Voigt, K. (1998). No increase in blood-brain barrier permeability after intraperitoneal injection of endotoxin in the rat. *Journal of Neuroimmunology* 85, 131-136.
- Blanque, R., Meakin, C., Millet, S., and Gardner, C.R. (1996). Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides : comparison with serum levels of IL-1b, IL-6 and TNF-alpha. *Genetic Pharmacology* 27, 973-977.
- Borges, K., Gearing, M., McDermott, D.L., Smith, A.B., Almonte, A.G., Wainer, B.H., and Dingledine, R. (2003). Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Experimental Neurology* 182, 21-34.
- Borges, K., McDermott, D., Irier, H., Smith, Y., and Dingledine, R. (2006). Degeneration and proliferation of astrocytes in the mouse dentate gyrus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Experimental Neurology* 201, 416-427.
- Bouchet, C., and Cazauvieilh, J.B. (1825). De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale. *Arch Gen Med* 9, 510-542.

- Bouilleret, V., Ridoux, V., Depaulis, A., Marescaux, C., Nehlig, A., and Le Gal La Salle, G. (1999). Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 89, 717-729.
- Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W.H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E.J., and Bethea, J.R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Experimental Medicine* 202, 145-156.
- Brandt, C., Potschka, H., Loscher, W., and Ebert, U. (2003). N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 118, 727-740.
- Brown, A. (1962). An eserine-like action of chloral hydrate. *British Journal of Pharmacology* 19, 111-119.
- Brown, D.A. (2006). Acetylcholine. *British Journal of Pharmacology* 147 Suppl 1, S120-126.
- Buckmaster, P.S., and Dudek, F.E. (1997). Network properties of the dentate gyrus in epileptic rats with hilar neuron loss and granule cell axon reorganization. *Journal of Neurophysiology* 77, 2685-2696.
- Buno, W., Cabezas, C., and Fernandez de Sevilla, D. (2006). Presynaptic muscarinic control of glutamatergic synaptic transmission. *Journal of Molecular Neuroscience* 30, 161-164.
- Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostensfeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297-308.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J.F., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et coll. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55, 1-12.
- Buzsaki, G., and Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304, 1926-1929.
- Campbell, I.L. (2005). Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis, and disease-associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS. *Brain Research. Brain Research Reviews* 48, 166-177.
- Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., et coll. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience* 9, 917-924.
- Carpenter, S., and O'Neill, L.A. (2009). Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins. *Biochemical Journal* 422, 1-10.
- Carpentier, P., Delamanche, I.S., Le Bert, M., Blanchet, G., and Bouchaud, C. (1990). Seizure-related opening of the blood-brain barrier induced by soman: possible correlation with the acute neuropathology observed in poisoned rats. *Neurotoxicology* 11, 493-508.
- Carpentier, P., Foquin-Tarricone, A., Bodjarian, N., Rondouin, G., Lerner-Natoli, M., Kamenka, J.M., Blanchet, G., Denoyer, M., and Lallement, G. (1994). Anticonvulsant and antilethal effects of the phencyclidine derivative TCP in soman poisoning. *Neurotoxicology* 15, 837-851.
- Carpentier, P., Foquin, A., Dorandeu, F., and Lallement, G. (2001a). Delta activity as an early indicator for soman-induced brain damage: a review. *Neurotoxicology* 22, 299-315.
- Carpentier, P., Foquin, A., Kamenka, J.M., Rondouin, G., Lerner-Natoli, M., de Groot, D.M., and Lallement, G. (2001b). Effects of thienylphencyclidine (TCP) on seizure activity and brain damage produced by soman in guinea-pigs: ECoG correlates of neurotoxicity. *Neurotoxicology* 22, 13-28.
- Carpentier, P., Foquin, A., Rondouin, G., Lerner-Natoli, M., de Groot, D.M., and Lallement, G. (2000). Effects of atropine sulphate on seizure activity and brain damage produced by soman in guinea-pigs: ECoG correlates of neuropathology. *Neurotoxicology* 21, 521-540.



Carpentier, P., Lambrinidis, M., and Blanchet, G. (1991). Early dendritic changes in hippocampal pyramidal neurones (field CA1) of rats subjected to acute soman intoxication: a light microscopic study. *Brain Research* 541, 293-299.

Carpentier, P., Testylier, G., Baille, V., Dhote, F., Job, A., Pouyatos, B., F., P., Foquin, A., Delacour, C., Hamilton, M., and Dorandeu, F. (2008). Soman-Induced Seizures and Related Brain Damage: How to Treat Seizures and Assess Their Effects Non-Invasively? *The Journal of Medical Chemical, Biological & Radiological defense* 6, [http://www.jmedcbr.org/issue\\_0601/Carpentier/Carpentier\\_0610\\_0608.html](http://www.jmedcbr.org/issue_0601/Carpentier/Carpentier_0610_0608.html).

Cavalheiro, E.A., Naffah Mazzacoratti, M.G., Mello, L.E., and Leite, J.P. (2006). The pilocarpine model of seizures. In *Models of seizures and epilepsy*, A. Pitkänen, P.A. Schwartzkroin, and S.L. Moshé, eds. (Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press).

Cavalheiro, E.A., Santos, N.F., and Priel, M.R. (1996). The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia* 37, 1015-1019.

Celerier, A., Ognard, R., Decorte, L., and Beracochea, D. (2000). Deficits of spatial and non-spatial memory and of auditory fear conditioning following anterior thalamic lesions in mice: comparison with chronic alcohol consumption. *European Journal of Neuroscience* 12, 2575-2584.

Celie, J.W., Beelen, R.H., and van den Born, J. (2009). Heparan sulfate proteoglycans in extravasation: assisting leukocyte guidance. *Frontiers in Bioscience* 14, 4932-4949.

Cendes, F. (2004). Febrile seizures and mesial temporal sclerosis. *Current Opinion in Neurology* 17, 161-164.

Chauviere, L., Raftafi, N., Thinus-Blanc, C., Bartolomei, F., Esclapez, M., and Bernard, C. (2009). Early deficits in spatial memory and theta rhythm in experimental temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience* 29, 5402-5410.

Chen, J., Marsh, T., Zhang, J.S., and Graham, S.H. (1995). Expression of cyclo-oxygenase 2 in rat brain following kainate treatment. *Neuroreport* 6, 245-248.

Chen, J.W., and Wasterlain, C.G. (2006). Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *Lancet Neurology* 5, 246-256.

Cho, Y.H., Friedman, E., and Silva, A.J. (1999). Ibotenate lesions of the hippocampus impair spatial learning but not contextual fear conditioning in mice. *Behavioural Brain Research* 98, 77-87.

Choi, H.B., Hong, S.H., Ryu, J.K., Kim, S.U., and McLarnon, J.G. (2003). Differential activation of subtype purinergic receptors modulates Ca(2+) mobilization and COX-2 in human microglia. *Glia* 43, 95-103.

Chopp, M., Li, Y., and Zhang, J. (2008). Plasticity and remodeling of brain. *Journal of the Neurological Sciences* 265, 97-101.

Cole-Edwards, K.K., and Bazan, N.G. (2005). Lipid signaling in experimental epilepsy. *Neurochemical Research* 30, 847-853.

Cole, A.E., and Nicoll, R.A. (1984). The pharmacology of cholinergic excitatory responses in hippocampal pyramidal cells. *Brain Research* 305, 283-290.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1981). Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures *Epilepsia* 22, 489-501.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes *Epilepsia* 30, 389-399.

Cook, N.L., Vink, R., Donkin, J.J., and van den Heuvel, C. (2009). Validation of reference genes for normalization of real-time quantitative RT-PCR data in traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Research* 87, 34-41.

- Cordero-Erausquin, M., Marubio, L.M., Klink, R., and Changeux, J.P. (2000). Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trends in Pharmacological Sciences* 21, 211-217.
- Coubard, S., Beracochea, D., Collombet, J.M., Philippin, J.N., Krazem, A., Liscia, P., Lallement, G., and Pierard, C. (2008). Long-term consequences of soman poisoning in mice: part 2. Emotional behavior. *Behavioural Brain Research* 191, 95-103.
- 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 Research* 952, 159-169.
- Crespel, A., Rigau, V., Coubes, P., Rousset, M.C., de Bock, F., Okano, H., Baldy-Moulinier, M., Bockaert, J., Lerner-Natoli, M. (2005). Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease* 19, 436-450.
- Crocker, B.A., Krebs, D.L., Zhang, J.G., Wormald, S., Willson, A.T., Stanley, E.G., Robb, L., Grennhalgh, C.J., Förster, I., Clausen, B.E., et coll. (2003). SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nature Immunology* 4, 540-545.
- Croker, B.A., Metcalf, D., Robb, L., Wei, W., Mifsud, S., DiRago, L., Cluse, L.A., Sutherland, K.D., Hartley, L., Williams, E., et coll. (2004). SOCS3 is a critical physiological negative regulator of G-CSF signaling and emergency granulopoiesis. *Immunity* 20, 153-165.
- Cunningham, E.T., Jr., and De Souza, E.B. (1993). Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunology Today* 14, 171-176.
- Curia G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R.S., Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods* 172, 143-157.
- D'Ambrosio, R., Fender, J.S., Fairbanks, J.P., Simon, E.A., Born, D.E., Doyle, D.L., and Miller, J.W. (2005). Progression from frontal-parietal to mesial-temporal epilepsy after fluid percussion injury in the rat. *Brain* 128, 174-188.
- Dajas-Bailador, F.A., Lima, P.A., and Wonnacott, S. (2000). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a Ca(2+) dependent mechanism. *Neuropharmacology* 39, 2799-2807.
- Damaj, M.I., Glassco, W., Dukat, M., and Martin, B.R. (1999). Pharmacological characterization of nicotine-induced seizures in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 291, 1284-1291.
- Dantzer, R., Bluthé, R.M., Gheusi, G., Cremona, S., Laye, S., Parnet, P., and Kelley, K.W. (1998). Molecular basis of sickness behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences* 856, 132-138.
- David, Y., Cacheaux, L.P., Ivens, S., Lapilover, E., Heinemann, U., Kaufer, D., and Friedman, A. (2009). Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis? *Journal of Neuroscience* 29, 10588-10599.
- Davies, N.M., Good, R.L., Roupe, K.A., and Yanez, J.A. (2004). Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?--Not as easy as 1, 2, 3. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7, 217-226.
- de Lanerolle, N.C., Kim, J.H., Williamson, A., Spencer, S.S., Zaveri, H.P., Eid, T., and Spencer, D.D. (2003). A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. *Epilepsia* 44, 677-687.
- de Lanerolle, N.C., and Lee, T.S. (2005). New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy and Behavior* 7, 190-203.
- De Rosa, M.J., Esandi Mdel, C., Garelli, A., Rayes, D., and Bouzat, C. (2005). Relationship between alpha 7 nAChR and apoptosis in human lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology* 160, 154-161.

- de Simoni, M.G., Perego, C., Ravizza, T., Moneta, D., Conti, M., Marchesi, F., De, L.A., Garattini, S., and Vezzani, A. (2000). Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *European Journal of Neuroscience* 12, 2623-2633.
- Depaulis, A. (2001). Physiopathologie des crises d'épilepsie. In *Encycl Med Chir, Neurologie* (Paris, Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS), p. 10.
- Derks, N.M., Muller, M., Gaszner, B., Tilburg-Ouwens, D.T., Roubos, E.W., and Kozicz, L.T. (2008). Housekeeping genes revisited: different expressions depending on gender, brain area and stressor. *Neuroscience* 156, 305-309.
- Desjardins, P., Sauvageau, A., Bouthillier, A., Navarro, D., Hazell, A.S., Rose, C., and Butterworth, R.F. (2003). Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. *Neurochemistry International* 42, 299-303.
- Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., and Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 37, 112-119.
- Dhote, F., Peinnequin, A., Carpentier, P., Baille, V., Delacour, C., Foquin, A., Lallement, G., and Dorandeu, F. (2007). Prolonged inflammatory gene response following soman-induced seizures in mice. *Toxicology* 238, 166-176.
- Diaz, G.F., Virues, T., San Martin, M., Ruiz, M., Galan, L., Paz, L., and Valdes, P. (1998). Generalized background qEEG abnormalities in localized symptomatic epilepsy. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 106, 501-507.
- Dinarello, C.A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77, 1627-1652.
- Dmowska, M., Cybulska, R., Schoenborn, R., Piersiak, T., Jaworska-Adamu, J., and Gawron, A. (2009). Behavioural and Histological Effects of Preconditioning with Lipopolysaccharide in Epileptic Rats. *Neurochemical Research*.
- Docagne, F., Campbell, S.J., Bristow, A.F., Poole, S., Vignes, S., Guaza, C., Perry, V.H., and Anthony, D.C. (2005). Differential regulation of type I and type II interleukin-1 receptors in focal brain inflammation. *European Journal of Neuroscience* 21, 1205-1214.
- Dodd, J., Dingleline, R., and Kelly, J.S. (1981). The excitatory action of acetylcholine on hippocampal neurones of the guinea pig and rat maintained in vitro. *Brain Research* 207, 109-127.
- Dogan, M.D., Ataoglu, H., and Akarsu, E.S. (2000). Effects of different serotypes of E. Coli lipopolysaccharides on body temperature in rats. *Life Sciences* 67, 2319-2329.
- Dong, Y., N., B.E., and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia*. 36, 180-190.
- Dorandeu, F., Carpentier, P., Baille, V., Dhote, F., Testylier, G., Pernot, F., Mion, G., Rüttimann, M., and Lallement, G. (2010). Field treatment of soman-induced self-sustaining status epilepticus. Are ketamine and other NMDA antagonists the only options? In *The Neurochemical Consequences of Organophosphate Poisoning in the CNS*, B.A. Weissman, and L. Raveh, eds. (Kerala, India: Transworld Research Network).
- Dragunow, M., Goulding, M., Faull, R.L., Ralph, R., Mee, E., and Frith, R. (1990). Induction of c-fos mRNA and protein in neurons and glia after traumatic brain injury: pharmacological characterization. *Experimental Neurology* 107, 236-248.
- Dube, C., Chen, K., Eghbal-Ahmadi, M., Brunson, K., Soltesz, I., and Baram, T.Z. (2000). Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Annals of Neurology* 47, 336-344.
- Dube, C., Vezzani, A., Behrens, M., Bartfai, T., and Baram, T.Z. (2005). Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Annals of Neurology* 57, 152-155.
- Dudek, F.E., Clark, S., Williams, P.A., and Grabenstatter, H.L. (2006). Kainate-induced status epilepticus: a chronic model of acquired epilepsy. In *Models of seizures and epilepsy*, A. Pitkänen, P.A. Schwartzkroin, and S.L. Moshé, eds. (San Diego: Elsevier Academic Press), p. 687.

Dugladze, T., Vida, I., Tort, A.B., Gross, A., Otahal, J., Heinemann, U., Kopell, N.J., and Gloveli, T. (2007). Impaired hippocampal rhythmogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17530-17535.

Edling, Y., Ingelman-Sundberg, M., and Simi, A. (2007). Glutamate activates *c-fos* in glial cells via a novel mechanism involving the glutamate receptor subtype mGlu5 and the transcriptional repressor DREAM. *Glia* 55, 328-340.

Egorov, A.V., and Muller, W. (1999). Subcellular muscarinic enhancement of excitability and Ca<sup>2+</sup>-signals in CA1-dendrites in rat hippocampal slice. *Neuroscience Letters* 261, 77-80.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr., and Feather-Stone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.

Elmslie, F.V., Rees, M., Williamson, M.P., Kerr, M., Kjeldsen, M.J., Pang, K.A., Sundqvist, A., Friis, M.L., Chadwick, D., Richens, A., et coll. (1997). Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Human Molecular Genetics* 6, 1329-1334.

Engel, J., Jr. (1996). Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 26, 141-150.

Engel, J., Jr. (2001). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 42, 796-803.

Engel, J.J., Williamson, P.D., and Wieser, H.G. (2008). Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, Vol 3rd, 2nd edn (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).

Engelhardt, B., and Ransohoff, R.M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends in Immunology* 26, 485-495.

Esclapez, M., Hirsch, J.C., Khazipov, R., Ben-Ari, Y., and Bernard, C. (1997). Operative GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons in experimental epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 12151-12156.

Fabene, P.F., Navarro Mora, G., Martinello, M., Rossi, B., Merigo, F., Ottoboni, L., Bach, S., Angiari, S., Benati, D., Chakir, A., et coll. (2008). A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nature Medicine* 14, 1377-1383.

Fabian-Fine, R., Skehel, P., Errington, M.L., Davies, H.A., Sher, E., Stewart, M.G., and Fine, A. (2001). Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 21, 7993-8003.

Fahrner, A., Kann, G., Flubacher, A., Heinrich, C., Freiman, T.M., Zentner, J., Frotscher, M., and Haas, C.A. (2007). Granule cell dispersion is not accompanied by enhanced neurogenesis in temporal lobe epilepsy patients. *Experimental Neurology* 203, 320-332.

Farooqui, A.A., and Horrocks, L.A. (2007). Arachidonic acid and its metabolites in brain. In *Glycerophospholipids in the brain: phospholipases A2 in neurological disorders*, A.A. Farooqui, and L.A. Horrocks, eds. (New York, USA: Springer Science).

Farooqui, A.A., Horrocks, L.A., and Farooqui, T. (2007). Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *Journal of Neurochemistry* 101, 577-599.

Farooqui, A.A., Ong, W.Y., and Horrocks, L.A. (2006). Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacological Reviews* 58, 591-620.

Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., and Sofroniew, M.V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience* 24, 2143-2155.

Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., and Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729-743.

Filipovic, R., and Zecevic, N. (2008). Neuroprotective role of minocycline in co-cultures of human fetal neurons and microglia. *Experimental Neurology* 211, 41-51.

Fisher, R.S., Bortz, J.J., Blum, D.E., Duncan, B., and Burke, H. (2001). A Pilot Study of Donepezil for Memory Problems in Epilepsy. *Epilepsy and Behavior* 2, 330-334.

Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., and Engel, J., Jr. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46, 470-472.

Fonck, C., Nashmi, R., Deshpande, P., Damaj, M.I., Marks, M.J., Riedel, A., Schwarz, J., Collins, A.C., Labarca, C., and Lester, H.A. (2003). Increased sensitivity to agonist-induced seizures, straub tail, and hippocampal theta rhythm in knock-in mice carrying hypersensitive alpha 4 nicotinic receptors. *Journal of Neuroscience* 23, 2582-2590.

Franz, S., Frey, B., Sheriff, A., Gaipf, U.S., Beer, A., Voll, R.E., Kalden, J.R., and Herrmann, M. (2006). Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. *Cytometry. Part A* 69, 230-239.

French, R.A., VanHoy, R.W., Chizzonite, R., Zachary, J.F., Dantzer, R., Parnet, P., Bluthe, R.M., and Kelley, K.W. (1999). Expression and localization of p80 and p68 interleukin-1 receptor proteins in the brain of adult mice. *Journal of Neuroimmunology* 93, 194-202.

Friedman, A., Behrens, C.J., and Heinemann, U. (2007). Cholinergic dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48 Suppl 5, 126-130.

Fujimoto, M., and Naka, T. (2003). Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends in Immunology* 24, 659-666.

Furtado, M.A., Braga, G.K., Oliveira, J.A., Del Vecchio, F., and Garcia-Cairasco, N. (2002). Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia* 43 Suppl 5, 37-39.

Furtado, M.D., Lumley, L.A., Robinson, C., Tong, L.C., and Yourick, D.L. (2009). Evaluation of spontaneous recurrent seizures after status epilepticus induced by organophosphorous compounds in Sprague-Dawley rats. Abstract 637.9/O25. American Society for Neuroscience Congress, Chicago, IL, U.S.A. Oct 20, 2009.

Gale, G.D., Anagnostaras, S.G., and Fanselow, M.S. (2001). Cholinergic modulation of pavlovian fear conditioning: effects of intrahippocampal scopolamine infusion. *Hippocampus* 11, 371-376.

Gibb, R., and Kolb, B. (1998). A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *Journal of Neuroscience Methods* 79, 1-4.

Gilbert, M.E., and Goodman, J.H. (2006). *Chemical kindling* (London: Elsevier Academic Press).

Gilsbach, R., Kouta, M., Bonisch, H., and Bruss, M. (2006). Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques* 40, 173-177.

Gobbo, O.L., and O'Mara, S.M. (2004). Post-treatment, but not pre-treatment, with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib markedly enhances functional recovery from kainic acid-induced neurodegeneration. *Neuroscience* 125, 317-327.

Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M.J., Schmitt, D., and Berthier-Vergnes, O. (2001). Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 295, 17-21.

Golarai, G., Greenwood, A.C., Feeney, D.M., and Connor, J.A. (2001). Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience* 21, 8523-8537.

Gotti, C., and Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology* 74, 363-396.

- Goux, E., Leveille, F., Nicole, O., Melon, C., Had-Aissouni, L., and Buisson, A. (2009). Reverse glial glutamate uptake triggers neuronal cell death through extrasynaptic NMDA receptor activation. *Molecular and Cellular Neurosciences* 40, 463-473.
- Grasshoff, C., Gillessen, T., Thiermann, H., Wagner, E., and Szinicz, L. (2003). The effect of acetylcholinesterase-inhibition on depolarization-induced GABA release from rat striatal slices. *Toxicology* 184, 149-156.
- Groticke, I., Hoffmann, K., and Loscher, W. (2008). Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate. *Experimental Neurology*.
- Haas, C.A., and Frotscher, M. (2009). Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy. *Experimental Brain Research*.
- Hailer, N.P. (2008). Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Progress in Neurobiology* 84, 211-233.
- Halliwel, J.V., and Adams, P.R. (1982). Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Research* 250, 71-92.
- Hamberger, M.J., Palmese, C.A., Scarmeas, N., Weintraub, D., Choi, H., and Hirsch, L.J. (2007). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil to improve memory in epilepsy. *Epilepsia* 48, 1283-1291.
- Harper, K.A., and Tyson-Capper, A.J. (2008). Complexity of COX-2 gene regulation. *Biochemical Society Transactions* 36, 543-545.
- Harrison, P.K., Sheridan, R.D., Green, A.C., and Tattersall, J.E. (2005). Effects of anticonvulsants on soman-induced epileptiform activity in the guinea-pig in vitro hippocampus. *European Journal of Pharmacology* 518, 123-132.
- Harry, G.J., Tyler, K., d'Hellencourt, C.L., Tilson, H.A., and Maier, W.E. (2002). Morphological alterations and elevations in tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1alpha, and IL-6 in mixed glia cultures following exposure to trimethyltin: modulation by proinflammatory cytokine recombinant proteins and neutralizing antibodies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 180, 205-218.
- Hart, B.L. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 12, 123-137.
- Harvey, B.D., and Sloviter, R.S. (2005). Hippocampal granule cell activity and c-Fos expression during spontaneous seizures in awake, chronically epileptic, pilocarpine-treated rats: implications for hippocampal epileptogenesis. *Journal of Comparative Neurology* 488, 442-463.
- Hasselmo, M.E., and Giocomo, L.M. (2006). Cholinergic modulation of cortical function. *Journal of Molecular Neuroscience* 30, 133-135.
- Hauss-Wegrzyniak, B., Vraniak, P.D., and Wenk, G.L. (2000). LPS-induced neuroinflammatory effects do not recover with time. *Neuroreport* 11, 1759-1763.
- Heinrich, C., Nitta, N., Flubacher, A., Muller, M., Fahrner, A., Kirsch, M., Freiman, T., Suzuki, F., Depaulis, A., Frotscher, M., and Haas, C.A. (2006). Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *Journal of Neuroscience* 26, 4701-4713.
- Hellsten, J., West, M.J., Arvidsson, A., Ekstrand, J., Jansson, L., Wennstrom, M., and Tingstrom, A. (2005). Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *Biological Psychiatry* 58, 871-878.
- Hetier, E., Ayala, J., Bousseau, A., Deneffe, P., and Prochiantz, A. (1990). Ameboid microglia cells and not astrocytes synthesize TNF-alpha in Swiss mouse brain cultures. *European Journal of Neuroscience* 2, 762-768.

Hinterkeuser, S., Schröder, W., Hager, G., Seifert, G., Blümcke, I., Elger, C.E., Schramm, J., Steinhäuser, C. (2000). Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy display changes in potassium conductances. *European Journal of Neuroscience* 12, 2087-2096.

Hirst, W.D., Young, K.A., Newton, R., Allport, V.C., Marriott, D.R., and Wilkin, G.P. (1999). Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Molecular and Cellular Neurosciences* 13, 57-68.

Holmes, G.L. (2002). Seizure-induced neuronal injury: animal data. *Neurology* 59, S3-6.

Holtman, L., van Vliet, E.A., van Schaik, R., Queiroz, C.M., Aronica, E., and Gorter, J.A. (2009). Effects of SC58236, a selective COX-2 inhibitor, on epileptogenesis and spontaneous seizures in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 84, 56-66.

Honchar, M.P., Olney, J.W., and Sherman, W.R. (1983). Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science* 220, 323-325.

Hosli, E., and Hosli, L. (1988). Autoradiographic localization of binding sites for muscarinic and nicotinic agonists and antagonists on cultured astrocytes. *Experimental Brain Research* 71, 450-454.

Houser, C.R. (1999). Neuronal loss and synaptic reorganization in temporal lobe epilepsy. *Advances in Neurology* 79, 743-761.

Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., and Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* 6, 279-284.

Hulkkonen, J., Koskikallio, E., Rainesalo, S., Keranen, T., Hurme, M., and Peltola, J. (2004). The balance of inhibitory and excitatory cytokines is differently regulated in vivo and in vitro among therapy resistant epilepsy patients. *Epilepsy Research* 59, 199-205.

Itoh, T., Satou, T., Nishida, S., Hashimoto, S., and Ito, H. (2007). Immature and mature neurons coexist among glial scars after rat traumatic brain injury. *Neurological Research* 29, 734-742.

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.

Ji, D., and Dani, J.A. (2000). Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons. *Journal of Neurophysiology* 83, 2682-2690.

Jiang, M., Lee, C.L., Smith, K.L., and Swann, J.W. (1998). Spine loss and other persistent alterations of hippocampal pyramidal cell dendrites in a model of early-onset epilepsy. *Journal of Neuroscience* 18, 8356-8368.

Joosen, M.J., and van Helden, H.P. (2007). Correlations between acetylcholinesterase inhibition, acetylcholine levels and EEG changes during perfusion with neostigmine and N6-cyclopentyladenosine in rat brain. *European Journal of Pharmacology* 555, 122-128.

Joseph, S.A., Lynd-Balta, E., O'Banion, M.K., Rappold, P.M., Daschner, J., Allen, A., and Padowski, J. (2006). Enhanced cyclooxygenase-2 expression in olfactory-limbic forebrain following kainate-induced seizures. *Neuroscience* 140, 1051-1065. .

Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., and Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature Neuroscience* 10, 331-339.

Jung, K.H., Chu, K., Lee, S.T., Kim, J., Sinn, D.I., Kim, J.M., Park, D.K., Lee, J.J., Kim, S.U., Kim, M., et coll. (2006). Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiology of Disease* 23, 237-246.

Kaczmarek, L., Lapinska-Dzwonek, J., and Szymczak, S. (2002). Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO Journal* 21, 6643-6648.

Kahane, P., Bureau, M., Revol, M., and Roger, J. (2002). *Les épilepsies partielles non idiopathiques de l'enfant*, 3rd edn (Eastleigh: John Libbey).

Kamikawa, H., Hori, T., Nakane, H., Aou, S., and Tashiro, N. (1998). IL-1beta increases norepinephrine level in rat frontal cortex: involvement of prostanoids, NO, and glutamate. *American Journal of Physiology* 275, R803-810.

Kaneko, S., Maeda, T., Kume, T., Kochiyama, H., Akaike, A., Shimohama, S., and Kimura, J. (1997). Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via alpha7-neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Research* 765, 135-140.

Kanemoto, K., Kawasaki, J., Miyamoto, T., Obayashi, H., and Nishimura, M. (2000). Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology* 47, 571-574.

Kang, T.C., Kim, D.S., Kwak, S.E., Kim, J.E., Won, M.H., Kim, D.W., Choi, S.Y., and Kwon, O.S. (2006). Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. *Glia* 54, 258-271.

Karhunen, H., Bezvenyuk, Z., Nissinen, J., Sivenius, J., Jolkkonen, J., and Pitkänen, A. (2007). Epileptogenesis after cortical photothrombotic brain lesion in rats. *Neuroscience* 148, 314-324.

Karhunen, H., Nissinen, J., Sivenius, J., Jolkkonen, J., and Pitkänen, A. (2006). A long-term video-EEG and behavioral follow-up after endothelin-1 induced middle cerebral artery occlusion in rats. *Epilepsy Research* 72, 25-38.

Karhunen, H., Pitkänen, A., Virtanen, T., Gureviciene, I., Pussinen, R., Ylinen, A., Sivenius, J., Nissinen, J., and Jolkkonen, J. (2003). Long-term functional consequences of transient occlusion of the middle cerebral artery in rats: a 1-year follow-up of the development of epileptogenesis and memory impairment in relation to sensorimotor deficits. *Epilepsy Research* 54, 1-10.

Katsuki, H., and Okuda, S. (1995). Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. *Progress in Neurobiology* 46, 607-636.

Kaufmann, W.E., Worley, P.F., Pegg, J., Bremer, M., and Isakson, P. (1996). COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2317-2321.

Kawaguchi, K., Hickey, R.W., Rose, M.E., Zhu, L., Chen, J., and Graham, S.H. (2005). Cyclooxygenase-2 expression is induced in rat brain after kainate-induced seizures and promotes neuronal death in CA3 hippocampus. *Brain Research* 1050, 130-137.

Kemppainen, E.J., Nissinen, J., and Pitkänen, A. (2006). Fear conditioning is impaired in systemic kainic acid and amygdala-stimulation models of epilepsy. *Epilepsia* 47, 820-829.

Kerschensteiner, M., Meinel, E., and Hohlfeld, R. (2009). Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience* 158, 1122-1132.

Khiroug, L., Giniatullin, R., Klein, R.C., Fayuk, D., and Yakel, J.L. (2003). Functional mapping and Ca<sup>2+</sup> regulation of nicotinic acetylcholine receptor channels in rat hippocampal CA1 neurons. *Journal of Neuroscience* 23, 9024-9031.

Khurgel, M., Switzer R. C., r., Switzer, R.C., 3rd, C., T.G., Teskey, G.C., E., S.A., Spiller, A.E., J., R.R., Racine, R.J., O., I.G., and Ivy, G.O. (1995). Activation of astrocytes during epileptogenesis in the absence of neuronal degeneration. *Neurobiol Dis.* 2, 23-35.

Kielian, T., and Drew, D. (2005). *Cytokines and brain: health and disease* (Totowa, New Jersey: Humana Press).

Kienzler, F., Norwood, B.A., and Sloviter, R.S. (2009). Hippocampal injury, atrophy, synaptic reorganization, and epileptogenesis after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in the mouse. *Journal of Comparative Neurology* 515, 181-196.



Kim, H.J., Chung, J.I., Lee, S.H., Jung, Y.S., Moon, C.H., and Baik, E.J. (2008). Involvement of endogenous prostaglandin F<sub>2</sub>alpha on kainic acid-induced seizure activity through FP receptor: the mechanism of proconvulsant effects of COX-2 inhibitors. *Brain Research* 1193, 153-161.

Kinsey, G.R., Cummings, B.S., Beckett, C.S., Saavedra, G., Zhang, W., McHowat, J., and Schnellmann, R.G. (2005). Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA<sub>2</sub>. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327, 287-293.

Klaassen, A., Glykys, J., Maguire, J., Labarca, C., Mody, I., and Boulter, J. (2006). Seizures and enhanced cortical GABAergic inhibition in two mouse models of human autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19152-19157.

Kluska, M.M., Witte, O.W., Bolz, J., and Redecker, C. (2005). Neurogenesis in the adult dentate gyrus after cortical infarcts: effects of infarct location, N-methyl-D-aspartate receptor blockade and anti-inflammatory treatment. *Neuroscience* 135, 723-735.

Kobayashi, H., O'Briain, D.S., Hirakawa, H., Wang, Y., and Puri, P. (1994). A rapid technique of acetylcholinesterase staining. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 118, 1127-1129.

Kobayashi, T., and Narumiya, S. (2002). Prostanoids in health and disease: lessons from receptor-knockout mice. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 507, 593-597.

Konopacki, J., MacIver, M.B., Bland, B.H., and Roth, S.H. (1987). Carbachol-induced EEG 'theta' activity in hippocampal brain slices. *Brain Research* 405, 196-198.

Kralic, J.E., Ledergerber, D.A., and Fritschy, J.M. (2005). Disruption of the neurogenic potential of the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. *European Journal of Neuroscience* 22, 1916-1927.

Kudo, I., and Murakami, M. (2002). Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 68-69, 3-58.

Kunz, T., and Oliw, E.H. (2001). Nimesulide aggravates kainic acid-induced seizures in the rat. *Pharmacology and Toxicology* 88, 271-276.

Kuruba, R., Hattiangady, B., and Shetty, A.K. (2009). Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy and Behavior* 14 Suppl 1, 65-73.

Lada-Moldovan, L., Kaloustian, S., Bah, T.M., Girard, S.A., Dery, M.A., and Rousseau, G. (2009). Chronic pretreatment with celecoxib reduces infarct size. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 54, 31-37.

Lai, A.Y., Swayze, R.D., El-Husseini, A., and Song, C. (2006). Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *Journal of Neuroimmunology* 175, 97-106.

Lallement, G., Carpentier, P., Collet, A., Pernot-Marino, I., Baubichon, D., and Blanchet, G. (1991). Effects of soman-induced seizures on different extracellular amino acid levels and on glutamate uptake in rat hippocampus. *Brain Research* 563, 234-240.

Lang, R., Pauleau, A.L., Parganas, E., Takahashi, Y., Mages, J., Ihle, J.N., Rutschman, R., and Murray, P.J. (2003). SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nature Immunology* 4, 546-550.

Laye, S., Parnet, P., Goujon, E., and Dantzer, R. (1994). Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Research. Molecular Brain Research* 27, 157-162.

Lee, S.C., Liu, W., Dickson, D.W., Brosnan, C.F., and Berman, J.W. (1993). Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes : differential induction by LPS and IL-1b. *Journal of Immunology* 150, 2659-2667.

Lemercier, G., Carpentier, P., Sentenac-Roumanou, H., and Morelis, P. (1983). *Histological and histochemical changes in the central nervous system of the rat poisoned by an irreversible anticholinesterase organophosphorus compound. Acta Neuropathologica* 61, 123-129.

Leon-Carrion, J., Martin-Rodriguez, J.F., Damas-Lopez, J., Barroso y Martin, J.M., and Dominguez-Morales, M.R. (2008). *Brain function in the minimally conscious state: a quantitative neurophysiological study. Clinical Neurophysiology* 119, 1506-1514.

Leranth, C., and Hajszan, T. (2007). *Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. Progress in Brain Research* 163, 63-84.

Leveille, F., El Gaamouch, F., Gouix, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O., and Buisson, A. (2008). *Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. FASEB Journal* 22, 4258-4271.

Lister, R.G. (1987). *The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology* 92, 180-185.

Little, A.R., and OCallaghan, J.P. (2001). *Astrogliosis in the adult and developing CNS: Is there a role for proinflammatory cytokines? Neurotoxicology* 22, 607-618.

Liu, B., Du, L., and Ilong, J.S. (2000a). *Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxyde generation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293, 607-617.

Liu, B., Du, L., Kong, L.Y., Hudson, P.M., Wilson, B.C., Chang, R.C., Abel, H.H., and Hong, J.S. (2000b). *Reduction by naloxone of LPS-induced neurotoxicity in mouse cortical neuron-glia co-cultures. Neuroscience* 97, 749-756.

Liu, B., Jiang, J., Wilson, B.C., Du, L., Yang, S., Wang, Z., and Wu, G. (2000c). *Systemic infusion of naloxone reduces degeneration of rat substantia nigra dopaminergic neurons induced by intranigral injection of LPS. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295, 125-132.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods* 25, 402-408.

Longo, B.M., and Mello, L.E. (1998). *Supragranular mossy fiber sprouting is not necessary for spontaneous seizures in the intrahippocampal kainate model of epilepsy in the rat. Epilepsy Research* 32, 172-182.

Lowenstein, D.H., Bleck, T., and Macdonald, R.L. (1999). *It's time to revise the definition of status epilepticus. Epilepsia* 40, 120-122.

Lowenstein, D.H., Thomas, M.J., Smith, D.H., and McIntosh, T.K. (1992). *Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. Journal of Neuroscience* 12, 4846-4853.

Luster, A.D., Alon, R., and von Andrian, U.H. (2005). *Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. Nature Immunology* 6, 1182-1190.

Madison, D.V., Lancaster, B., and Nicoll, R.A. (1987). *Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. Journal of Neuroscience* 7, 733-741.

Marino, M.J., Rouse, S.T., Levey, A.I., Potter, L.T., and Conn, P.J. (1998). *Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11465-11470.

Masson, P., and Rochu, D. (2009). *Catalytic bioscavengers: the next generation of bioscavenger-based medical countermeasures. In Handbook of toxicology of chemical warfare agents, R.C. Gupta, ed. (Berlington, MA, USA: Elsevier Academic Press), p. 1200.*

- Mathern, G.W., Kuhlman, P.A., Mendoza, D., and Pretorius, J.K. (1997). Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56, 199-212.
- Matoh, I., Pinto, F., Sicsic, C., and Brenner, T. (2000). Inhibitory effect of carbamazepine on inflammatory mediators produced by stimulated microglial cells. *Neuroscience Research* 38, 209-212.
- Mattson, M.P. (1989). Acetylcholine potentiates glutamate-induced neurodegeneration in cultured hippocampal neurons. *Brain Research* 497, 402-406.
- McCormick, D.A., and Prince, D.A. (1985). Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6344-6348.
- McDonough, J., Jr., McLeod, C., Jr., and Nipwoda, M.T. (1987). Direct microinjection of soman or VX into the amygdala produces repetitive limbic convulsions and neuropathology. *Brain Research* 435, 123-137.
- McDonough, J.H., and Shih, T.M. (1997). Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 21, 559-579.
- McIntyre, D.C. (2006). *The kindling phenomenon* (London: Elsevier Academic Press).
- McIntyre, D.C., Poulter, M.O., and Gilby, K. (2002). Kindling: some old and some new. *Epilepsy Research* 50, 79-92.
- McKay, B.E., and Persinger, M.A. (2004). Normal spatial and contextual learning for ketamine-treated rats in the pilocarpine epilepsy model. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 78, 111-119.
- McMahon, L.L., Williams, J.H., and Kauer, J.A. (1998). Functionally distinct groups of interneurons identified during rhythmic carbachol oscillations in hippocampus in vitro. *Journal of Neuroscience* 18, 5640-5651.
- McVicar, B.A., and Tse, F.W. (1989). Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices. *The Journal of Physiology* 417, 197-212.
- Mello, L.E., Kohman, C.M., Tan, A.M., Cavaleiro, E.A., and Finch, D.M. (1996). Lack of Fos-like immunoreactivity after spontaneous seizures or reinduction of status epilepticus by pilocarpine in rats. *Neuroscience Letters* 208, 133-137.
- Meurs, A., Clinckers, R., Ebinger, G., Michotte, Y., and Smolders, I. (2006). Substantia nigra is an anticonvulsant site of action of topiramate in the focal pilocarpine model of limbic seizures. *Epilepsia* 47, 1519-1535.
- Meurs, A., Clinckers, R., Ebinger, G., Michotte, Y., and Smolders, I. (2008). Seizure activity and changes in hippocampal extracellular glutamate, GABA, dopamine and serotonin. *Epilepsy Research* 78, 50-59.
- Mikula, S., Stone, J.M., Berman, A.L., and Jones, E.G. (2006). A digital stereotaxic atlas of the brain of the monkey, *Macaca mulatta* Available at [www.brainmaps.org](http://www.brainmaps.org) where regular updates and new material will be posted.
- Minami, M., Kuraishi, Y., Yabuuchi, K., Yamazaki, A., and Satoh, M. (1992). Induction of interleukin-1 beta mRNA in rat brain after transient forebrain ischemia. *Journal of Neurochemistry* 58, 390-392.
- Mitsuya, K., Nitta, N., and Suzuki, F. (2009). Persistent zinc depletion in the mossy fiber terminals in the intrahippocampal kainate mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 50, 1979-1990.
- Mohapel, P., Armitage, L.L., Gilbert, T.H., Hannesson, D.K., Teskey, G.C., and Corcoran, M.E. (2000). Mossy fiber sprouting is dissociated from kindling of generalized seizures in the guinea-pig. *Neuroreport* 11, 2897-2901.
- Molloy, G.Y., Rattray, M., and Williams, R.J. (1998). Genes encoding multiple forms of phospholipase A2 are expressed in rat brain. *Neuroscience Letters* 258, 139-142.
- Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., and Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237, 192-197.

Morgan, J.I., and Curran, T. (1989). Calcium and proto-oncogene involvement in the immediate-early response in the nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 568, 283-290.

Morgan, R., Kreipke, C.W., Roberts, G., Bagchi, M., and Rafols, J.A. (2007). Neovascularization following traumatic brain injury: possible evidence for both angiogenesis and vasculogenesis. *Neurological Research* 29, 375-381.

Muller, C.J., Bankstahl, M., Groticke, I., and Loscher, W. (2009). Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. *European Journal of Pharmacology* 619, 15-24.

Myer, D.J., Gurkoff, G.G., Lee, S.M., Hovda, D.A., and Sofroniew, M.V. (2006). Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 129, 2761-2772.

Myhrer, T. (2007). Neuronal structures involved in the induction and propagation of seizures caused by nerve agents: implications for medical treatment. *Toxicology* 239, 1-14.

Myhrer, T., Andersen, J.M., Nguyen, N.H., and Aas, P. (2005). Soman-induced convulsions in rats terminated with pharmacological agents after 45 min: neuropathology and cognitive performance. *Neurotoxicology* 26, 39-48.

Narkilahti, S., Nissinen, J., and Pitkänen, A. (2003). Administration of caspase 3 inhibitor during and after status epilepticus in rat: effect on neuronal damage and epileptogenesis. *Neuropharmacology* 44, 1068-1088.

Navarro, V. (2006). Transmission non synaptique et synchronies : quel rôle dans l'activité épileptique. *Neurologies* 9, 539-543.

Navarro, F.P. (2007). Inflammation et infiltration monocytaire associées à la dégénérescence neuronale induite par un status epilepticus chez le rat. *Physiologie et Neurosciences Doctorate*, 215.

Navarro, F.P., Fares, R.P., Sanchez, P.E., Nadam, J., Georges, B., Moulin, C., Morales, A., Pequignot, J.M., and Bezin, L. (2008). Brain heparanase expression is up-regulated during postnatal development and hypoxia-induced neovascularization in adult rats. *Journal of Neurochemistry* 105, 34-45.

Navarro Mora, G., Bramanti, P., Osculati, F., Chakir, A., Nicolato, E., Marzola, P., Sbarbati, A., and Fabene, P.F. (2009). Does pilocarpine-induced epilepsy in adult rats require status epilepticus? *PLoS ONE* 4, e5759.

Nestler, E., Hyman, S., and Malenka, R. (2008). *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience* (New York, USA: McGraw-Hill Medical Publishing).

Nguyen, K.T., Deak, T., Owens, S.M., Kohno, T., Fleshner, M., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (1998). Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *Journal of Neuroscience* 18, 2239-2246.

Oby, E., and Janigro, D. (2006). The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia* 47, 1761-1774.

Oh, M.M., Power, J.M., Thompson, L.T., Moriearty, P.L., and Disterhoft, J.F. (1999). Metrifonate increases neuronal excitability in CA1 pyramidal neurons from both young and aging rabbit hippocampus. *Journal of Neuroscience* 19, 1814-1823.

Ohnishi, M., Katsuki, H., Takagi, M., Kume, T., and Akaike, A. (2009). Long-term treatment with nicotine suppresses neurotoxicity of, and microglial activation by, thrombin in cortico-striatal slice cultures. *European Journal of Pharmacology* 602, 288-293.

Oliveira, M.S., Furian, A.F., Royes, L.F., Figuera, M.R., Fiorenza, N.G., Castelli, M., Machado, P., Bohrer, D., Veiga, M., Ferreira, J., et coll. (2008). Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylene-tetrazol-induced seizures. *Epilepsy Research* 79, 14-21.

Ollat, H. (2001). *Peur et anxiété. Neuropsychiatrie : tendances et débats*; [http://www.neuropsychiatrie.fr/extranet/upload/article/944036416\\_19-28%20Peur%20et%20anxi%C3%A9t%C3%A9.pdf](http://www.neuropsychiatrie.fr/extranet/upload/article/944036416_19-28%20Peur%20et%20anxi%C3%A9t%C3%A9.pdf) 12, 19-28.

- Olney, J.W., Collins, R.C., and Sloviter, R.S. (1986). Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Advances in Neurology* 44, 857-877.
- Orr-Urtreger, A., Broide, R.S., Kasten, M.R., Dang, H., Dani, J.A., Beaudet, A.L., and Patrick, J.W. (2000). Mice homozygous for the L250T mutation in the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor show increased neuronal apoptosis and die within 1 day of birth. *Journal of Neurochemistry* 74, 2154-2166.
- Osten, P., Wisden, W., and Sprengel, R. (2007). *Molecular mechanisms of synaptic function in the hippocampus: neurotransmitter exocytosis and glutamatergic, GABAergic, and cholinergic neurotransmission* (New York: Oxford University Press).
- Ovsepian, S.V. (2008). Differential cholinergic modulation of synaptic encoding and gain control mechanisms in rat hippocampus. *Neuroscience Research* 61, 92-98.
- Pallud, J. (2005). Rôle des connexions longitudinales de l'hippocampe dans l'épilepsie de la face mésiale du lobe temporal. Approche par transection dans un modèle chronique chez la souris. Master II de Biologie Intégrative et Physiologie. *Neurosciences*, 20.
- Pallud, J., Devaux, B., and Depaulis, A. (2008). [Changes in spontaneous epileptic activity after selective intrahippocampal transection in a model of chronic mesial temporal lobe epilepsy]. *Neuro-Chirurgie* 54, 135-140.
- Panegyres, P.K., and Hughes, J. (1998). The neuroprotective effects of the recombinant interleukin-1 receptor antagonist rhIL-1ra after excitotoxic stimulation with kainic acid and its relationship to the amyloid precursor protein gene. *Journal of the Neurological Sciences* 154, 123-132.
- Parent, J.M., and Murphy, G.G. (2008). Mechanisms and functional significance of aberrant seizure-induced hippocampal neurogenesis. *Epilepsia* 49 Suppl 5, 19-25.
- Pavlov, V.A., Parrish, W.R., Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Puerta, M., Ochani, K., Chavan, S., Al-Abed, Y., and Tracey, K.J. (2009). Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior and Immunity* 23, 41-45.
- Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (New York).
- Peinnequin, A., Mouret, C., Birot, O., Alonso, A., Mathieu, J., Clarencon, D., Agay, D., Chancerelle, Y., and Multon, E. (2004). Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunology* 5, 3.
- Peng, Z., and Houser, C.R. (2005). Temporal patterns of fos expression in the dentate gyrus after spontaneous seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience* 25, 7210-7220.
- Penkowa, M., Molinero, A., Carrasco, J., and Hidalgo, J. (2001). Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* 102, 805-818.
- Penkowa, M., Moos, T., Carrasco, J., Hadberg, H., Molinero, A., Bluethmann, H., and Hidalgo, J. (1999). Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 25, 343-357.
- Perea, G., and Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317, 1083-1086.
- Phillips, R.G., and Le Doux, J.E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* 106, 274-285.
- Phillips, R.G., and Le Doux, J.E. (1994). Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learning and Memory* 1, 34-44.
- Pitkänen, A., Kharatishvili, I., Karhunen, H., Lukasiuk, K., Immonen, R., Nairismagi, J., Grohn, O., and Nissinen, J. (2007). Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia* 48 Suppl 2, 13-20.
- Pitkänen, A., and McIntosh, T.K. (2006). Animal models of post-traumatic epilepsy. *Journal of Neurotrauma* 23, 241-261.

Pitler, T.A., and Alger, B.E. (1992). Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *The Journal of Physiology* 450, 127-142.

*Proceedings of the American Epilepsy Society Course (1993). Status epilepticus Epilepsia 34 Suppl 1, S1-81.*

Properzi, F., Lin, R., Kwok, J., Naidu, M., van Kuppevelt, T.H., Ten Dam, G.B., Camargo, L.M., Raha-Chowdhury, R., Furukawa, Y., Mikami, T., et coll. (2008). Heparan sulphate proteoglycans in glia and in the normal and injured CNS: expression of sulphotransferases and changes in sulphation. *European Journal of Neuroscience* 27, 593-604.

Quan, N., Sundar, S.K., and Weiss, J.M. (1994). Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology* 49, 125-134.

Raiteri, M., Marchi, M., and Paudice, P. (1990). Presynaptic muscarinic receptors in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 604, 113-129.

Ravizza, T., Gagliardi, B., Noe, F., Boer, K., Aronica, E., and Vezzani, A. (2008). Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease* 29, 142-160.

Ravizza, T., Lucas, S.M., Balosso, S., Bernardino, L., Ku, G., Noe, F., Malva, J., Randle, J.C., Allan, S., and Vezzani, A. (2006). Inactivation of caspase-1 in rodent brain: a novel anticonvulsive strategy. *Epilepsia* 47, 1160-1168.

Rebenko-Moll, N.M., Liu, L., Cardona, A., and Ransohoff, R.M. (2006). Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. *Current Opinion in Immunology* 18, 683-689.

Rezai-Zadeh, K., Gate, D., and Town, T. (2009). CNS Infiltration of Peripheral Immune Cells: D-Day for Neurodegenerative Disease? *Journal of Neuroimmune Pharmacology*.

Riazi, K., Galic, M.A., Kuzmiski, J.B., Ho, W., Sharkey, K.A., and Pittman, Q.J. (2008). Microglial activation and TNF $\alpha$  production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17151-17156.

Riban, V., Bouillere, V., Pham-Le, B.T., Fritschy, J.M., Marescaux, C., and Depaulis, A. (2002). Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 112, 101-111.

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.

Rijkers, K., Majoie, H.J., Hoogland, G., Kenis, G., De Baets, M., and Vles, J.S. (2009). The role of interleukin-1 in seizures and epilepsy: a critical review. *Experimental Neurology* 216, 258-271.

Robb, L., Boyle, K., Rakar, S., Hartley, L., Lochland, J., Roberts, A.W., Alexander, W.S., and Metcalf, D. (2005). Genetic reduction of embryonic leukemia-inhibitory factor production rescues placentation in SOCS3-null embryos but does not prevent inflammatory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16333-16338.

Rona, S., Rosenow, F., Arnold, S., Carreno, M., Diehl, B., Ebner, A., Fritsch, B., Hamer, H.M., Holthausen, H., Knake, S., et coll. (2005). A semiological classification of status epilepticus. *Epileptic Disorders* 7, 5-12.

Rosenzweig, H.L., Minami, M., Lessov, N.S., Coste, S.C., Stevens, S.L., Henshall, D.C., Meller, R., Simon, R.P., and Stenzel-Poore, M.P. (2007). Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNF $\alpha$  after stroke: a novel role for TNF $\alpha$  in LPS-ischemic tolerance. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27, 1663-1674.

Rothwell, N.J. (1997). Neuroimmune interactions. *British Journal of Pharmacology* 121, 841-847.

Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., and Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322, 1551-1555.

- Rouse, S.T., Thomas, T.M., and Levey, A.I. (1997). Muscarinic acetylcholine receptor subtype, m2: diverse functional implications of differential synaptic localization. *Life Sciences* 60, 1031-1038.
- Salgado, H., Bellay, T., Nichols, J.A., Bose, M., Martinolich, L., Perrotti, L., and Atzori, M. (2007). Muscarinic M2 and M1 receptors reduce GABA release by Ca<sup>2+</sup> channel modulation through activation of PI3K/Ca<sup>2+</sup> -independent and PLC/Ca<sup>2+</sup> -dependent PKC. *Journal of Neurophysiology* 98, 952-965.
- Samad, T.A., Moore, K.A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, J.V., and Woolf, C.J. (2001). Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410, 471-475.
- Santos, A.R., and Duarte, C.B. (2008). Validation of internal control genes for expression studies: effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research* 86, 3684-3692.
- Santos, N.F., Marques, R.H., Correia, L., Sinigaglia-Coimbra, R., Calderazzo, L., Sanabria, E.R., and Cavalleiro, E.A. (2000). Multiple pilocarpine-induced status epilepticus in developing rats: a long-term behavioral and electrophysiological study. *Epilepsia* 41, S57-63.
- Sayyah, M., Javad-Pour, M., and Ghazi-Khansari, M. (2003). The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide and prostaglandins. *Neuroscience* 122, 1073-1080.
- Schaloske, R.H., and Dennis, E.A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761, 1246-1259.
- Scheibel, M.E., Crandall, P.H., and Scheibel, A.B. (1974). The hippocampal-dentate complex in temporal lobe epilepsy. A Golgi study. *Epilepsia* 15, 55-80.
- Scheiderer, C.L., Smith, C.C., McCutchen, E., McCoy, P.A., Thacker, E.E., Kolasa, K., Dobrunz, L.E., and McMahon, L.L. (2008). Coactivation of M(1) muscarinic and alpha1 adrenergic receptors stimulates extracellular signal-regulated protein kinase and induces long-term depression at CA3-CA1 synapses in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 28, 5350-5358.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols* 3, 1101-1108.
- Schmittgen, T.D., and Zakrajsek, B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 46, 69-81.
- 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. *Journal of Neuroscience* 24, 7829-7836.
- Semah, F., Picot, M.C., Adam, C., Broglin, D., Arzimanoglou, A., Bazin, B., Cavalcanti, D., and Baulac, M. (1998). Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 51, 1256-1262.
- Servent, D., and Fruchart-Gaillard, C. (2009). Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *Journal of Neurochemistry* 109, 1193-1202.
- Shapiro, L.A., Wang, L., and Ribak, C.E. (2008). Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia* 49 Suppl 2, 33-41.
- Sharifzadeh, M., Naghdi, N., Khosrovani, S., Ostad, S.N., Sharifzadeh, K., and Roghani, A. (2005). Post-training intrahippocampal infusion of the COX-2 inhibitor celecoxib impaired spatial memory retention in rats. *European Journal of Pharmacology* 511, 159-166.
- Shih, T.M., and McDonough, J.H., Jr. (1997). Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. *Journal of Applied Toxicology* 17, 255-264.

- Shih, T.M., and McDonough, J.H., Jr. (1999). Organophosphorus nerve agents-induced seizures and efficacy of atropine sulfate as anticonvulsant treatment. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 64, 147-153.
- Shimohama, S. (2009). Nicotinic receptor-mediated neuroprotection in neurodegenerative disease models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32, 332-336.
- Shpargel, K.B., Jalabi, W., Jin, Y., Dadabayev, A., Penn, M.S., and Trapp, B.D. (2008). Preconditioning paradigms and pathways in the brain. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 75 Suppl 2, S77-82.
- Shytle, R.D., Mori, T., Townsend, K., Vendrame, M., Sun, N., Zeng, J., Ehrhart, J., Silver, A.A., Sanberg, P.R., and Tan, J. (2004). Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *Journal of Neurochemistry* 89, 337-343.
- Silman, I., and Sussman, J.L. (2008). Acetylcholinesterase: how is structure related to function? *Chemico-Biological Interactions* 175, 3-10.
- Silverberg, J., Ginsburg, D., Orman, R., Amassian, V., Durkin, H.G., and Stewart, M. (2009). Lymphocyte infiltration of neocortex and hippocampus after a single brief seizure in mice. *Brain Behavior and Immunity*. Epub.
- Sloviter, R.S. (1991). Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1, 41-66.
- Sloviter, R.S. (1992). Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neuroscience Letters* 137, 91-96.
- Sloviter, R.S. (2005). The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *Comptes Rendus Biologies* 328, 143-153.
- Sloviter, R.S. (2008). Hippocampal epileptogenesis in animal models of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: the importance of the "latent period" and other concepts. *Epilepsia* 49 Suppl 9, 85-92.
- Sloviter, R.S., and Dempster, D.W. (1985). "Epileptic" brain damage is replicated qualitatively in the rat hippocampus by central injection of glutamate or aspartate but not by GABA or acetylcholine. *Brain Research Bulletin* 15, 39-60.
- Smith, W.L., and Song, I. (2002). The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 68-69, 115-128.
- Smolders, I., Khan, G.M., Manil, J., Ebinger, G., and Michotte, Y. (1997). NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *British Journal of Pharmacology* 121, 1171-1179.
- Smolders, I., Lindekens, H., Clinckers, R., Meurs, A., O'Neill, M.J., Lodge, D., Ebinger, G., and Michotte, Y. (2004). In vivo modulation of extracellular hippocampal glutamate and GABA levels and limbic seizures by group I and II metabotropic glutamate receptor ligands. *Journal of Neurochemistry* 88, 1068-1077.
- Spencer, S.S. (2002). When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically? *Lancet Neurology* 1, 375-382.
- Steinlein, O.K., Mulley, J.C., Propping, P., Wallace, R.H., Phillips, H.A., Sutherland, G.R., Scheffer, I.E., and Berkovic, S.F. (1995). A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature Genetics* 11, 201-203.
- Stenzel-Poore, M.P., Stevens, S.L., King, J.S., and Simon, R.P. (2007). Preconditioning reprograms the response to ischemic injury and primes the emergence of unique endogenous neuroprotective phenotypes: a speculative synthesis. *Stroke* 38, 680-685.
- Stief, F., Zuschratter, W., Hartmann, K., Schmitz, D., and Draguhn, A. (2007). Enhanced synaptic excitation-inhibition ratio in hippocampal interneurons of rats with temporal lobe epilepsy. *European Journal of Neuroscience* 25, 519-528.



- Stoll, C., Eltze, M., Lambrecht, G., Zentner, J., Feuerstein, T.J., and Jackisch, R. (2009). Functional characterization of muscarinic autoreceptors in rat and human neocortex. *Journal of Neurochemistry* 110, 837-847.
- Streit, W.J., A., W.S., Walter, S.A., A., P.N., and Pennell, N.A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol.* 57, 563-581.
- Streit, W.J., and Kreutzberg, G.W. (1987). Lectin binding by resting and reactive microglia. *Journal of Neurocytology* 16, 249-260.
- Sun, G.Y., Xu, J., Jensen, M.D., and Simonyi, A. (2004). Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Lipid Research* 45, 205-213.
- Sutula, T.P., and Dudek, F.E. (2007). Unmasking recurrent excitation generated by mossy fiber sprouting in the epileptic dentate gyrus: an emergent property of a complex system. *Progress in Brain Research* 163, 541-563.
- Suzuki, F., Junier, M.P., Guilhem, D., Sorensen, J.C., and Onteniente, B. (1995). Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 64, 665-674.
- Suzuki, T., Hide, I., Matsubara, A., Hama, C., Harada, K., Miyano, K., Andra, M., Matsubayashi, H., Sakai, N., Kohsaka, S., et coll. (2006). Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *Journal of Neuroscience Research* 83, 1461-1470.
- Takahashi, H., Matsumoto, H., Smirkin, A., Itai, T., Nishimura, Y., and Tanaka, J. (2008). Involvement of heparanase in migration of microglial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780, 709-715.
- Taupin, V., Gogusev, J., Descamps-Latscha, B., and Zavala, F. (1993). Modulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression in human monocytes by an endogenous angiogenic benzodiazepine ligand, triakontatetrapeptide: evidence for a role of prostaglandins. *Molecular Pharmacology* 43, 64-69.
- Taylor, A.L., and Hewett, S.J. (2002). Potassium-evoked glutamate release liberates arachidonic acid from cortical neurons. *Journal of Biological Chemistry* 277, 43881-43887.
- Teper, Y., Whyte, D., Cahir, E., Lester, H.A., Grady, S.R., Marks, M.J., Cohen, B.N., Fonck, C., McClure-Begley, T., McIntosh, J.M., et coll. (2007). Nicotine-induced dystonic arousal complex in a mouse line harboring a human autosomal-dominant nocturnal frontal lobe epilepsy mutation. *Journal of Neuroscience* 27, 10128-10142.
- Testylier, G., Lahrech, H., Montigon, O., Foquin, A., Delacour, C., Bernabe, D., Segebarth, C., Dorandeu, F., and Carpentier, P. (2007). Cerebral edema induced in mice by a convulsive dose of soman. Evaluation through diffusion-weighted magnetic resonance imaging and histology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 220, 125-137.
- Testylier, G., Tonduli, L., and Lallement, G. (1999). Implication of gamma band in soman-induced seizures. *Acta Biotheoretica* 47, 191-197.
- Thom, M., Zhou, J., Martinian, L., and Sisodiya, S. (2005). Quantitative post-mortem study of the hippocampus in chronic epilepsy: seizures do not inevitably cause neuronal loss. *Brain* 128, 1344-1357.
- Timofeeva, O.A., and Gordon, C.J. (2001). Changes in EEG power spectra and behavioral states in rats exposed to the acetylcholinesterase inhibitor chlorpyrifos and muscarinic agonist oxotremorine. *Brain Research* 893, 165-177.
- Tokime, T., Nozaki, K., and Kikuchi, H. (1996). Neuroprotective effect of FK506, an immunosuppressant, on transient global ischemia in gerbil. *Neuroscience Letters* 206, 81-84.
- Tonduli, L.S., Testylier, G., Marino, I.P., and Lallement, G. (1999). Triggering of soman-induced seizures in rats: multiparametric analysis with special correlation between enzymatic, neurochemical and electrophysiological data. *Journal of Neuroscience Research* 58, 464-473.

- Toscano, C.D., Kingsley, P.J., Marnett, L.J., and Bosetti, F. (2008). NMDA-induced seizure intensity is enhanced in COX-2 deficient mice. *Neurotoxicology* 29, 1114-1120.
- Tu, B., and Bazan, N.G. (2003). Hippocampal kindling epileptogenesis upregulates neuronal cyclooxygenase-2 expression in neocortex. *Experimental Neurology* 179, 167-175.
- Turrin, N.P., Gayle, D., Ilyin, S.E., Flynn, M.C., Langhans, W., Schwartz, G.J., and Plata-Salaman, C.R. (2001). Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial LPS. *Brain Research Bulletin* 54, 443-453.
- Turrin, N.P., and Rivest, S. (2004). Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiology of Disease* 16, 321-334.
- 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.
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., and Turski, L. (1983a). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural Brain Research* 9, 315-335.
- Turski, W.A., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., and Turski, L. (1983b). Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia* 39, 1408-1411.
- Tyagi, E., Agrawal, R., Nath, C., and Shukla, R. (2009a). Cholinergic protection via alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and PI3K-Akt pathway in LPS induced neuroinflammation. *Neurochemistry International*.
- Tyagi, E., Agrawal, R., Nath, C., and Shukla, R. (2009b). Inhibitory role of cholinergic system mediated via {alpha}7 nicotinic acetylcholine receptor in LPS-induced neuro-inflammation. *Innate Immun.*
- van Loo, G., De Lorenzi, R., Schmidt, H., Huth, M., Mildner, A., Schmidt-Supprian, M., Lassmann, H., Prinz, M.R., and Pasparakis, M. (2006). Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nature Immunology* 7, 954-961.
- van Vliet, E.A., da Costa 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, 521-534.
- Van Wagoner, N.J., and Benveniste, E.N. (1999). Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *Journal of Neuroimmunology* 100, 124-139.
- Vandesompele, J., De, P.K., Pattyn, F., Poppe, B., Van, R.N., De, P.A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, 34.
- Verma, S., Nakaoka, R., Dohgu, S., and Banks, W.A. (2006). Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain, Behavior and Immunity* 20, 449-455.
- Vezzani, A., and Baram, T.Z. (2007). New roles for interleukin-1beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Currents* 7, 45-50.
- Vezzani, A., Conti, M., De Luigi, A., Ravizza, T., Moneta, D., Marchesi, F., and de Simoni, M.G. (1999). Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *Journal of Neuroscience* 19, 5054-5065.
- Vezzani, A., and Granata, T. (2005). Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46, 1724-1743.
- Vezzani, A., and Janigro, D. (2009). Leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy: cheers and jeers. *Epilepsy Currents* 9, 118-121.

- Vezzani, A., Moneta, D., Conti, M., Richichi, C., Ravizza, T., De Luigi, A., De Simoni, M.G., Sperk, G., Andell-Jonsson, S., Lundkvist, J., et coll. (2000). Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11534-11539.
- Vibert, J.-F., Sébille, A., Lavallard-Rousseau, M.-C., and Boureau, F. (2005). *Neurophysiologie : De la physiologie à l'exploration fonctionnelle* (Paris).
- Vincent, P., and Mulle, C. (2009). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158, 309-323.
- Virta, M., Hurme, M., and Helminen, M. (2002). Increased plasma levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with febrile seizures. *Epilepsia* 43, 920-923.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M.M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di, L.M., Galli, C.L., and Marinovich, M. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *Journal of Neuroscience* 23, 8692-8700.
- Viviani, B., and Marinovich, M. (2004). Cytokines in neuronal-glia interaction. In *The role of glia in neurotoxicity*, M. Aschner, and L.G. Costa, eds. (Boca Raton, Florida, USA: CRC Press).
- Wallenstein, G.V., and Vago, D.R. (2001). Intrahippocampal scopolamine impairs both acquisition and consolidation of contextual fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory* 75, 245-252.
- Wang, D.D., and Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology* 86, 342-367.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C.A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J.H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., et coll. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421, 384-388.
- Wang, S., Cheng, Q., Malik, S., and Yang, J. (2000). Interleukin-1beta inhibits gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292, 497-504.
- Wang, Y., Weiss, M.T., Yin, J., Tenn, C.C., Nelson, P.D., and Mikler, J.R. (2008). Protective effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism on VX-induced neuronal cell death in cultured rat cortical neurons. *Neurotoxicity Research* 13, 163-172.
- Wang, Y.S., and White, T.D. (1999). The bacterial endotoxin lipopolysaccharide causes rapid inappropriate excitation in rat cortex. *Journal of Neurochemistry* 72, 652-660.
- Wasterlain, C.G., Fujikawa, D.G., Penix, L., and Sankar, R. (1993). Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus. *Epilepsia* 34, S37-53.
- Wasterlain, C.G., and Jonec, V. (1980). Muscarinic kindling: transsynaptic generation of a chronic seizure focus. *Life Sciences* 26, 387-391.
- Watters, T.M., Kenny, E.F., and O'Neill, L.A. (2007). Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunology and Cell Biology* 85, 411-419.
- Welsby, P.J., Rowan, M.J., and Anwyl, R. (2009). Intracellular mechanisms underlying the nicotinic enhancement of LTP in the rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience* 29, 65-75.
- Wessler, I., Reinheimer, T., Klapproth, H., Schneider, F.J., Racke, K., and Hammer, R. (1997). Mammalian glial cells in culture synthesize acetylcholine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 356, 694-697.
- Wetherington, J., Serrano, G., and Dingledine, R. (2008). Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* 58, 168-178.
- Wieser, H.G. (2004). ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 45, 695-714.

- Williams, J.H., and Kauer, J.A. (1997). Properties of carbachol-induced oscillatory activity in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 78, 2631-2640.
- Williams, P.A., Dou, P., and Dudek, F.E. (2004). Epilepsy and synaptic reorganization in a perinatal rat model of hypoxia-ischemia. *Epilepsia* 45, 1210-1218.
- Williamson, P.D., and Engel, J.J. (2008). *Anatomic classification of focal epilepsies, Vol 3rd, 2nd edn* (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).
- Willoughby, J.O., Mackenzie, L., Medvedev, A., and Hiscock, J.J. (1997). Fos induction following systemic kainic acid: early expression in hippocampus and later widespread expression correlated with seizure. *Neuroscience* 77, 379-392.
- Wojtowicz, J.M. (2008). Potential consequences of altered neurogenesis on learning and memory in the epileptic brain. *Epilepsia* 49 Suppl 5, 42-49.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., and Eyer, P. (1999). Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta* 288, 73-90.
- Ye, Z.C., H., S., and Sontheimer, H. (1996). Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. *Neuroreport* 7, 2181-2185.
- Yermakova, A., and O'Banion, M.K. (2000). Cyclooxygenases in the central nervous system: implications for treatment of neurological disorders. *Current Pharmaceutical Design* 6, 1755-1776.
- Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Reviews. Immunology* 7, 454-465.
- Yuhas, Y., Nofech-Mozes, Y., Weizman, A., and Ashkenazi, S. (2002). Enhancement of PTZ-induced seizures by *Shigella dysenteriae* in LPS-resistant C3H/HeJ mice : role of the host response. *Medical Microbiology and Immunology* 190, 173-178.
- Yuhas, Y., Weizman, A., Dinari, G., and Ashkenazi, S. (1995). An animal model for the study of neurotoxicity of bacterial products and application of the model to demonstrate that Shiga toxin and LPS cooperate in inducing neurologic disorders. *Journal of Infectious Diseases* 171.
- Zawadzka, M., and Kaminska, B. (2005). A novel mechanism of FK506-mediated neuroprotection: downregulation of cytokine expression in glial cells. *Glia* 49, 36-51.
- Zeise, M.L., J., E., Espinoza, J., P., M., Morales, P., A., N., and Nalli, A. (1997). Interleukin-1beta does not increase synaptic inhibition in hippocampal CA3 pyramidal and dentate gyrus granule cells of the rat in vitro. *Brain Research* 768, 341-344.
- Zhao, C.S., and Overstreet-Wadiche, L. (2008). Integration of adult generated neurons during epileptogenesis. *Epilepsia* 49 Suppl 5, 3-12.
- Zhao, Q., and Holmes, G.L. (2006). *Repetitive seizures in the immature brain* (London: Elsevier Academic Press).
- Zimmer, L.A., Ennis, M., el-Etri, M., and Shipley, M.T. (1997). Anatomical localization and time course of Fos expression following soman-induced seizures. *Journal of Comparative Neurology* 378, 468-481.
- Zimmerman, G., Njunting, M., Ivens, S., Tolner, E., Behrens, C.J., Gross, M., Soreq, H., Heinemann, U., and Friedman, A. (2008). Acetylcholine-induced seizure-like activity and modified cholinergic gene expression in chronically epileptic rats. *European Journal of Neuroscience* 27, 965-975.

## ***Résumé***

Le processus d'épileptogenèse, qui conduit à la production de décharges électro-encéphalographiques spontanées caractéristiques de la maladie épileptique, implique des mécanismes inconnus pour la plupart et probablement divers. Des études récentes soulignent le rôle potentiel de l'inflammation cérébrale dans les mécanismes précoces de l'épileptogenèse. Le syndrome d'épilepsie de la face mésiale du lobe temporal (EMLT) est souvent associé à une perte neuronale unilatérale et sélective dans l'hippocampe, suggérant que cette structure est particulièrement sensible. Notre travail a donc été consacré à l'étude de l'épileptogenèse faisant suite à l'injection intrahippocampique de toxiques chimiques capables d'entraîner des modifications tissulaires et cellulaires locales chez la souris C57BL/6. Le rôle potentiel de la neuro-inflammation a été plus particulièrement recherché. Dans notre premier modèle, un déséquilibre cholinergique est induit par l'injection de soman, un puissant inhibiteur des cholinestérases. Il est capable d'induire un processus d'épileptogenèse sans état de mal initial, associé à un déficit de la réponse émotionnelle conditionnée contextuelle mais en l'absence de remaniements tissulaires majeurs (neurodégénérescence, œdème et neuro-inflammation). En revanche, dans le modèle d'EMLT obtenu par l'injection de kaïnate, une forte activation microgliale est détectée précocement dans les zones de neurodégénérescence. Une astrogliose est également observée. Grâce à la technique quantitative de transcription inverse suivie de polymérisation en chaîne (RT-qPCR), nous avons également pu mettre en évidence que certains médiateurs moléculaires de l'inflammation sont également liés dans le temps et dans l'espace (particulièrement la transcription d'IL-1 $\beta$ ) aux événements neurodégénératifs. Pour s'assurer de la fiabilité des données analytiques de RT-qPCR dans les régions cérébrales touchées par ces modifications, le choix des gènes de référence doit faire l'objet d'études spécifiques. Nous avons pu montrer qu'un ensemble de cinq gènes (*Hprt1*, *Ppia*, *Tbp*, *Actb* et *Arbp*) avait une forte stabilité dans la structure hippocampique dans ce modèle murin d'EMLT et pouvait être utilisé pour normaliser les données brutes de RT-qPCR dans ce modèle.

Nos résultats indiquent que, chez la souris, des altérations neurochimiques sont capables d'initier l'épileptogenèse même en l'absence de lésions tissulaires notables et qu'une réponse neuro-inflammatoire massive n'est pas une condition *sine qua non*. Déterminer le caractère bénéfique ou délétère de la neuro-inflammation reste un enjeu majeur pour la découverte de nouvelles thérapeutiques anti-épileptogènes.

## ***Abstract***

Epileptogenesis, which leads to the occurrence of spontaneous electroencephalographic fits that are a key feature of epilepsy, arises from mostly unknown and probably diverse mechanisms. Recent studies stress that cerebral inflammation may be involved in the early events of epileptogenesis. The mesiotemporal lobe epilepsy (MTLE) syndrome is often associated to a unilateral hippocampal neuronal loss stressing that hippocampus is a particularly sensitive region of the brain. Our work focused on epileptogenesis that follows the intrahippocampal injection of chemical toxicants that are able to induce local tissular and cellular modifications in C57BL/6 mice. The potential role of neuro-inflammation was of particular interest. In our first model, a cholinergic imbalance was created by the injection of soman, a potent cholinesterase inhibitor. It was able to induce epileptogenesis without an initial *status epilepticus* and a deficit in the contextual fear conditioning test. Interestingly no major tissular changes (neuronal damage, edema and neuro-inflammation) could be observed. Conversely, in the murine MLTE model obtained with the injection of kainate, a strong microglial reaction could quickly be observed in the areas showing neuronal damage. Astrogliosis was also present. Thanks to reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), we could show that changes in mRNA levels of some neuroinflammatory mediators (especially d'IL-1 $\beta$ ) were related to the time course of neuronal degenerescence in areas showing damage. For the RT-qPCR data, from samples obtained from these regions, to be reliably considered, appropriate sets of reference genes have to be determined. We showed that a group of five genes (Hprt1, Ppia, Tbp, Actb et Arbp) were highly stable in the hippocampus of mice experiencing MTLE and could be used to normalize raw data from RT-qPCR in this model.

All in all, our results stress the fact that, in mice, neurochemical modifications are able to induce epileptogenesis even when no tissular lesions could be noticed and that massive neuro-inflammation is not a *sine qua non* condition. To determine if neuro-inflammation is beneficial or deleterious is still a major research thrust as this may lead to the discovery of new antiepileptogenic drugs.