



HAL
open science

Phénomènes neuro-inflammatoires au cours de l'état de mal épileptique induit par le soman. Correction par des combinaisons atropine-kétamine.

Franck Dhote

► To cite this version:

Franck Dhote. Phénomènes neuro-inflammatoires au cours de l'état de mal épileptique induit par le soman. Correction par des combinaisons atropine-kétamine.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT: . tel-00559682

HAL Id: tel-00559682

<https://theses.hal.science/tel-00559682v1>

Submitted on 26 Jan 2011

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

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



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

Franck DHOTE

le 9 décembre 2010

**PHÉNOMÈNES NEURO-INFLAMMATOIRES AU COURS DE L'ÉTAT DE MAL
ÉPILEPTIQUE INDUIT PAR LE SOMAN.
CORRECTION PAR DES COMBINAISONS ATROPINE-KÉTAMINE.**

Thèse dirigée par le Pr. Frédéric DORANDEU

JURY

Pr Alain BUISSON	Université de Grenoble	Président
Dr Mireille LERNER-NATOLI	Directeur de recherche, CNRS, Montpellier	Rapporteur
Dr Laurent BEZIN	Chargé de recherche, CNRS, Lyon	Rapporteur
Dr Etienne AUDINAT	Directeur de recherche, CNRS, Paris	Examineur
Dr Stéphane AUVIN	Médecin, Inserm, Hôpital Robert Debré, Paris	Examineur
Dr Christophe PIÉRARD	Pharmacien en chef, IRBA, Brétigny-sur-Orge	Examineur
Dr Damien RICARD	Médecin en chef, HIA du Val-de-Grâce, Paris	Examineur

Thèse préparée au sein du Département de Toxicologie et risques chimiques de l'Institut de recherche biomédicale des armées, dans l'Ecole Doctorale Ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement.

Sommaire

SOMMAIRE	3
LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	15
REMERCIEMENTS	17
INTRODUCTION GENERALE	19
PUBLICATIONS / COMMUNICATIONS	21
SECTION A – INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	23
CHAPITRE I – CRISES EPILEPTIQUES ET EPILEPSIE	25
I. MECANISMES DES CRISES D’EPILEPSIE ET DE L’ETAT DE MAL EPILEPTIQUE	27
I.1 CRISES EPILEPTIQUES ET ETAT DE MAL	27
I.1.1 Les crises d’épilepsie	27
I.1.2 L’état de mal épileptique.....	28
I.2 NEUROCHIMIE DE LA CRISE EPILEPTIQUE ET DES EME	30
I.3 LE GLUTAMATE	32
I.3.1 Métabolisme	32
I.3.2 Les récepteurs du glutamate	34
I.3.2.1 Les récepteurs ionotropes	34
I.3.2.2 Les récepteurs métabotropes.....	41
I.3.3 Rôle des récepteurs au glutamate dans la pérennisation des crises.....	42
II. CONSEQUENCES PATHOLOGIQUES DES CRISES EPILEPTIQUES ET DES EME	43
II.1 REPERCUSSIONS CEREBRALES DIRECTES DE L’EME : EXCITOTOXICITE ET MORT NEURONALE	43
II.2 CONSEQUENCES SYSTEMIQUES ET RETENTISSEMENT CEREBRAL SECONDAIRE.....	44
II.3 ÉPILEPTOGENESE	45
III. TRAITEMENTS DE LA CRISE D’EPILEPSIE, DE L’EME, ET DE L’EME REFRACTAIRE 50	
III.1 TRAITEMENT DES CRISES D’EPILEPSIE.....	50
III.2 TRAITEMENT DE L’EME	51
CHAPITRE II – L’INTOXICATION PAR LES NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORES	55
I. MECANISMES D’ACTION	57
II. MODIFICATIONS NEUROCHIMIQUES AU COURS DE L’INTOXICATION PAR LE SOMAN 58	
III. CONSEQUENCES CLINIQUES DE L’INTOXICATION ET PRISE EN CHARGE MEDICALE 62	
CHAPITRE III – SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET INFLAMMATION	67
I. LES MEDIEURS CELLULAIRES DE LA REPOSE INFLAMMATOIRE CEREBRALE	70
I.1 LA MICROGLIE	70
I.2 LES ASTROCYTES.....	74
I.3 AUTRES ACTEURS CELLULAIRES	79
II. LES MEDIEURS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA REPOSE INFLAMMATOIRE CEREBRALE	79
II.1 LES DIFFERENTS ACTEURS DE LA REPOSE NEURO-INFLAMMATOIRE.....	80
II.1.1 Les cytokines pro-inflammatoires	80
II.1.1.1 L’interleukine-1	80

II.1.1.2	Le Tumor Necrosis Factor α	86
II.1.1.3	L'interleukine-6.....	89
II.1.2	<i>Les cytokines chimiotactiques ou chimiokines</i>	92
II.1.2.1	CXCL1.....	95
II.1.2.2	CCL5.....	95
II.1.3	<i>Les molécules d'adhésion</i>	96
II.1.4	<i>Métabolites et dérivés de l'acide arachidonique</i>	97
II.1.4.1	La production d'acide arachidonique par les phospholipases A ₂	97
II.1.4.2	La synthèse des prostaglandines.....	102
II.2	LESIONS CEREBRALES, EPILEPSIE, EXCITOTOXICITE ET INFLAMMATION CENTRALE.....	106
II.2.1	<i>Cytokines, cellules gliales et épilepsie : effets protecteurs ou délétères ?</i>	107
II.2.2	<i>Interrelations entre cerveau, inflammation périphérique et épilepsie</i>	108
III.	MOYENS DE PREVENTION OU DE CONTROLE DE LA NEURO-INFLAMMATION.....	111
III.1	IMPACT DE LA MODULATION DE L'INFLAMMATION SUR LES LESIONS CEREBRALES.....	111
III.1.1	<i>Utilisation de traitements anti-inflammatoires</i>	111
III.1.2	<i>Modulation de la communication entre le cerveau et la circulation périphérique</i>	113
III.1.3	<i>Modulation de l'interaction entre l'IL-1β et sa cible</i>	114
III.2	ANESTHESIQUES GENERAUX, NEUROPROTECTION ET INFLAMMATION.....	115
	CHAPITRE 4 – LA KETAMINE.....	117
I.	RAPPELS PHARMACOLOGIQUES.....	119
I.1	NATURE MOLECULAIRE.....	119
I.1.1	<i>Une molécule dérivée de la phencyclidine</i>	119
I.1.2	<i>Deux énantiomères aux propriétés pharmacologiques différentes</i>	119
I.2	PHARMACOCINETIQUE.....	120
I.3	PHARMACODYNAMIE.....	122
I.3.1	<i>Action sur les récepteurs au glutamate</i>	123
I.3.1.1	Antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA.....	123
I.3.1.2	Action sur les récepteurs au glutamate non-NMDA.....	124
I.3.2	<i>Action sur le système cholinergique</i>	124
I.3.2.1	Action sur les récepteurs nicotiniques.....	124
I.3.2.2	Action sur les récepteurs muscariniques.....	125
I.3.3	<i>Agoniste des récepteurs opioïdes μ et κ</i>	125
I.3.4	<i>Action sur les récepteurs monoaminergiques</i>	126
I.3.4.1	Action sur les récepteurs noradrénergiques.....	126
I.3.4.2	Action sur les récepteurs dopaminergiques et sérotoninergiques.....	126
I.3.5	<i>Inhibition générale des courants sodiques et calciques</i>	127
II.	KETAMINE ET TRAITEMENT DES INTOXICATIONS PAR LES NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORES.....	127
II.1	LES ANTAGONISTES DES RECEPTEURS GLUTAMATERGIQUES DANS LE CADRE DE LA LUTTE CONTRE LES INTOXICATIONS PAR LES NOP.....	128
II.2	INTERET DE LA KETAMINE DANS LE TRAITEMENT DE L'EME INDUIT PAR L'INTOXICATION PAR LES NOP.....	130
II.2.1	<i>Effets antiépileptiques et neuroprotecteurs</i>	130
II.2.2	<i>Action anti-inflammatoire</i>	132
II.2.2.1	Action anti-inflammatoire périphérique.....	132
II.2.2.2	Action anti-inflammatoire sur les cellules gliales.....	133
II.2.3	<i>Autres propriétés intéressantes dans le cadre du traitement des intoxications par organophosphorés</i>	133
II.2.3.1	Action bronchodilatatrice.....	133
II.2.3.2	Action sur la pression intracrânienne.....	134
	SECTION B – TRAVAUX EXPERIMENTAUX.....	135
	ETUDE I – PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INTOXICATION EXPERIMENTALE PAR LE SOMAN ET REPONSE NEURO-INFLAMMATOIRE CENTRALE.....	137
I.	INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	139
II.	PROTOCOLES D'ETUDES.....	140

II.1	EFFETS DE L'INTOXICATION SUR NOTRE MODELE D'ETUDE : EFFETS GENERAUX ET LESIONS CEREBRALES	140
II.2	ÉTUDE DE DIFFERENTS PARAMETRES DE LA REPONSE NEURO-INFLAMMATOIRE	141
II.2.1	<i>Réponse cellulaire</i>	141
II.2.2	<i>Réponse moléculaire</i>	142
III.	RESULTATS	144
III.1	EFFETS DE L'INTOXICATION.....	144
III.1.1	<i>Effets généraux</i>	144
III.1.2	<i>Lésions cellulaires</i>	145
III.2	REPONSE NEURO-INFLAMMATOIRE CELLULAIRE.....	150
III.2.1	<i>Activation microgliale</i>	150
III.2.2	<i>Activation astrocytaire</i>	152
III.2.3	<i>Présence de granulocytes neutrophiles dans le parenchyme cérébral</i>	154
III.3	REPONSE NEURO-INFLAMMATOIRE MOLECULAIRE	157
III.3.1	<i>Etude des modifications de la concentration cérébrale de l'ARNm de médiateurs de l'inflammation et d'enzymes de la voie des eicosanoïdes</i>	157
III.3.2	<i>Étude des modifications de la synthèse cérébrale des enzymes de la voie des eicosanoïdes par immunohistochimie</i>	163
III.3.2.1	<i>Phospholipase A2 cytosolique α (cPLA2α)</i>	163
III.3.2.2	<i>Cyclo-oxygénase 2</i>	165
III.3.2.3	<i>Prostaglandine D-synthase hématopoïétique (hPGDS)</i>	168
III.3.2.4	<i>Prostaglandine E-synthase microsomale de type 1 (m-PGES-1)</i>	171
III.3.3	<i>Étude des variations cérébrales de l'activité d'enzymes de la voie des eicosanoïdes</i>	172
IV.	ÉLÉMENTS DE DISCUSSION	173
IV.1	INTOXICATION PAR LE SOMAN : CONSEQUENCES SUR L'ÉTAT GENERAL ET SUR LE DEVELOPPEMENT DE LESIONS CEREBRALES CHEZ LES ANIMAUX INTOXIQUES	173
IV.2	CINETIQUE DU DEVELOPPEMENT DES LESIONS ET DES MODIFICATIONS CELLULAIRES DU PARENCHYME CEREBRAL A LA SUITE DE L'INTOXICATION PAR UNE DOSE CONVULSIVANTE DE SOMAN	174
IV.2.1	<i>Dommages cellulaires</i>	174
IV.2.2	<i>Modifications cellulaires du parenchyme cérébral et réaction inflammatoire</i>	175
IV.3	ÉVOLUTION DES MEDIATEURS MOLECULAIRES DE L'INFLAMMATION DANS LE SNC APRES INTOXICATION PAR LE SOMAN	179
IV.3.1	<i>Limites méthodologiques</i>	179
IV.3.2	<i>Intoxication par le soman et cytokines pro-inflammatoires</i>	180
IV.3.3	<i>Intoxication par le soman et infiltration du parenchyme cérébral par des cellules périphériques</i>	185
IV.3.4	<i>Étude de l'impact de l'intoxication par le soman sur les enzymes de la voie des eicosanoïdes</i> 188	
ÉTUDE II – ÉTUDE DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR ET ANTI-INFLAMMATOIRE DE L'ADMINISTRATION DE 2 COMBINAISONS D'UNE ASSOCIATION ATROPINE-KETAMINE CHEZ LA SOURIS INTOXIQUEE PAR UNE DOSE CONVULSIVANTE DE SOMAN..... 199		
I.	INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'EXPERIMENTATION	201
II.	PROTOCOLE D'ETUDE.....	203
II.1	MODELE D'ETUDE ET PROTOCOLE DE TRAITEMENT	203
II.2	EFFETS GENERAUX DE L'ADMINISTRATION DE COMBINAISONS THERAPEUTIQUES SUR NOTRE MODELE D'ETUDE : EFFETS GENERAUX ET LESIONS CEREBRALES.....	206
II.3	EFFETS DE L'ADMINISTRATION DE COMBINAISONS THERAPEUTIQUES SUR LA REPONSE INFLAMMATOIRE	207
II.3.1	<i>Réponse cellulaire</i>	207
II.3.2	<i>Réponse moléculaire</i>	208
III.	RESULTATS	208
III.1	EFFET DE L'ADMINISTRATION DE COMBINAISONS THERAPEUTIQUES SUR LES CRISES D'EPILEPSIE, L'ÉTAT GENERAL, LA MORTALITE ET L'ÉVOLUTION DE LA MASSE CORPORELLE.....	208
III.1.1	<i>Observations cliniques</i>	208
III.1.2	<i>Mortalité</i>	210
III.1.3	<i>Évolution de la masse corporelle</i>	211

III.2	EFFETS DE L'ADMINISTRATION DE COMBINAISONS THERAPEUTIQUES SUR LES LESIONS CEREBRALES INDUITES PAR LE SOMAN	212
III.3	EFFETS DE L'ADMINISTRATION DE COMBINAISONS THERAPEUTIQUES SUR LES MODIFICATIONS CELLULAIRES DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE INDUITES PAR LE SOMAN.....	213
III.4	EFFET DE L'ADMINISTRATION DE COMBINAISONS THERAPEUTIQUES SUR L'ARNM ET LES PROTEINES DE MEDIATEURS DE L'INFLAMMATION 48 H APRES INTOXICATION PAR LE SOMAN	219
IV.	ÉLÉMENTS DE DISCUSSION	223
IV.1	MEDIATEURS DE L'INFLAMMATION CHEZ LES ANIMAUX INTOXIQUES : EVOLUTION DES TAUX RELATIFS D'ARNM ET DE LA CONCENTRATION DES PROTEINES CORRESPONDANTES	223
IV.2	EFFETS DE L'ADMINISTRATION DES DIFFERENTES COMBINAISONS KET/SA CHEZ LES ANIMAUX INTOXIQUES	224
IV.2.1	<i>Effets de l'administration répétée de KET/SA sur les convulsions et la narcose</i>	<i>224</i>
IV.2.2	<i>Effets de l'administration répétée de KET/SA les convulsions, la narcose et la mortalité.....</i>	<i>225</i>
IV.2.3	<i>Effets neuroprotecteurs de l'administration répétée de KET/SA.....</i>	<i>226</i>
IV.2.4	<i>Effets de l'administration de KET/SA sur la réponse neuro-inflammatoire.....</i>	<i>228</i>
V.	EXPERIMENTATIONS COMPLEMENTAIRES	233
V.1	ÉVALUATION DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE DU PROTOCOLE KET100/SA MODIFIE	233
V.1.1	<i>Étude de l'efficacité de l'administration unique ou répétée d'une combinaison KET100/SA toutes les 60 min.....</i>	<i>234</i>
V.1.2	<i>Étude de l'efficacité d'une modification du protocole KET100/SA en décalant la 3e injection de KET/SA au moment de la fin de l'anesthésie.....</i>	<i>237</i>
V.2	EFFETS DE LA COMBINAISON THERAPEUTIQUES KET100/SA SUR LE BOURGEONNEMENT DES FIBRES MOUSSUES – ETUDE PRELIMINAIRE.....	241
	SYNTHESE.....	247
	PERSPECTIVES	253
	SECTION C – MATERIELS ET METHODES.....	259
	ANIMAUX, INTOXICATION ET TRAITEMENTS.....	261
I.	ANIMAUX	261
II.	COMPOSANTS CHIMIQUES UTILISES.....	261
III.	INTOXICATION DES ANIMAUX	262
IV.	TRAITEMENT DES ANIMAUX PAR LE SULFATE D'ATROPINE ET LA KETAMINE.....	263
	QUANTIFICATION DES ARNM PAR RT-QPCR.....	265
I.	PRELEVEMENT DES CERVEAUX ET MICRODISSECTION DES STRUCTURES CEREBRALES	265
II.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET PREPARATION DES ARN TOTAUX	266
III.	LA REACTION DE TRANSCRIPTION INVERSE.....	267
IV.	AMPLIFICATION QUANTITATIVE DES ADNC CIBLES PAR PCR EN TEMPS REEL.....	268
IV.1	PRINCIPE DE LA PCR EN TEMPS REEL.....	268
IV.2	CONCEPTION DES AMORCES ET OPTIMISATION DES CONDITIONS DE LA QPCR	269
IV.3	AMPLIFICATION QUANTITATIVE DE L'ADNC CIBLE	270
V.	NORMALISATION DES DONNEES	272
	DOSAGE PROTEIQUE PAR ANALYSES MULTIPLEXEES - TECHNOLOGIE LUMINEX®	275
I.	EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES SUR HOMOGENATS TISSULAIRES	275
II.	DOSAGE DES PROTEINES TOTALES.....	276
III.	DOSAGE DES PROTEINES PAR LA TECHNOLOGIE LUMINEX®	276
	MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE COX TOTALE ET PLA2 TOTALE.....	277
I.	EXTRACTION DES PROTEINES SUR HOMOGENATS TISSULAIRES.....	277

II. DOSAGE DES PROTEINES TOTALES PAR LA METHODE BCA.....	277
III. MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES.....	278
III.1 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE PLA2 TOTALE.....	278
III.2 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE COX TOTALE.....	278
<i>HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHEMIE.....</i>	281
I. PREPARATION DES TISSUS PERFUSES : FIXATION ET PRELEVEMENT DES CERVEAUX	281
II. DETECTIONS HISTOCHEMIQUES.....	282
II.1 TRAITEMENT DES COUPES PARAFFINEES.....	282
II.2 COLORATION A L'HEMALUN-PHLOXINE.....	283
II.3 DETECTION HISTOCHEMIQUE DES CELLULES MICROGLIALES.....	283
II.4 DETECTION DES FIBRES MOUSSUES.....	283
III. DETECTIONS IMMUNOHISTOCHEMIQUES.....	284
IV. METHODE D'EVALUATION CHIFFREE DE L'INTENSITE DES DOMMAGES	
CELLULAIRES ET DE L'ACTIVATION GLIALE.....	287
IV.1 DOMMAGES CELLULAIRES.....	287
IV.2 ACTIVATION MICROGLIALE.....	290
IV.3 ACTIVATION ASTROCYTAIRE.....	292
<i>ANALYSES STATISTIQUES.....</i>	295
<i>BIBLIOGRAPHIE.....</i>	297
<i>RESUME.....</i>	343
<i>ABSTRACT.....</i>	345

Liste des abréviations

A

AA : acide arachidonique
ACh : acétylcholine
AChE : acétylcholinestérase
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien
AIS : anti-inflammatoire stéroïdien
AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyle-4-isoxazolepropionique
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
AN : acide nucléique
ANOVA : analyse de variance
AP : antéropostérieur
Arbp : phosphoprotéine ribosomale acide A
ARNm : acide ribonucléique messenger
ARNr : acide ribonucléique ribosomal
ASC : aire sous la courbe
AVC : accident vasculaire cérébral

B

BA : β -actine
BHE : barrière hémato-encéphalique
BDNF : brain-derived neurotrophic factor

C

CA : corne d'Ammon
ChE : cholinestérase
CNTF : facteur neurotrophique ciliaire
COP : composé organophosphoré
COX-1, 2, 3 : cyclo-oxygénase-1, 2, 3
Cq : cycle de quantification
CV : coefficient de variation

D

DAB : diaminobenzidine
DL₅₀ : dose létale 50
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNTP : désoxynucléotide triphosphate
DS : déviation standard

E

E : efficacité de l'amplification
EAAT : excitatory amino acid transporters
EEG : électroencéphalographie
EME : état de mal épileptique
EMER : état de mal épileptique réfractaire aux traitements
EPOX : époxygénase
ERO : espèces réactives de l'oxygène
ERN : espèces réactives de l'azote
ES : erreur standard

G

GABA : acide γ -aminobutyrique
GABAA : récepteur GABA de type A
Gapdh : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GD : gyrus denté
GFAP : protéine acide des gliofilaments
Glu : glutamate
GNN : granulocytes neutrophiles
GSA-IB4 : isolectine IB4 de *Griffonia simplicifolia*

H

HI-6 : 1-2-hydroxy-iminométhyl-1-pyridino-3-(4-carbamoyl-1-pyridino-2-oxanopropane)
HIC : hypertension intracrânienne
H&P : hemalun-phloxine
Hprt1 : hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1

I

ICAM-1 : intra-cellular adhesion molecule-1
iGluR : récepteur ionotrope du glutamate
IL : interleukine
IL-1 β : interleukine 1 β
IL-ra : interleukine 1 receptor antagonist
IL-1RAcP : protéine accessoire du récepteur de l'interleukine-1
IL-6 : interleukine 6
IL-11 : interleukine 11
ILAE : *International League Against Epilepsy*
iNOS : inductible nitric oxide synthase

J

JAK : janus kinase

K

KA : acide kaïnique
KAR : récepteur kaïnate
KET : kétamine

L

LCS : liquide céphalo-spinal
LIF : facteur inhibiteur leucémique
LPS : lipopolysaccharide
LOX : lipoxygénase

M

MAPK : protéine kinase activée par des mitogènes
MCP-1 : monocyte chemotactic protein-1
MMP : métalloprotéinase matricielle

N

NGF : nerve growth factor
NMA : nitrate de méthyl-atropine
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NO : monoxyde d'azote
NOP : neurotoxique organophosphoré

O

OP : organophosphorés
OMS : organisation mondiale de la santé

P

PB : tampon phosphate (phosphate buffer)
PBS : tampon phosphate salin (phosphate buffer saline)
PCP : phencyclidine
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PF : paraformaldéhyde
hPGDS : prostaglandine D-synthase hématopoïétique
PGE₂ : prostaglandine E₂
PGES : prostaglandine E synthase
cPGES : prostaglandine E synthase cytosolique
mPGES : prostaglandine E synthase microsomale
PGG₂ : prostaglandine G₂
PGH₂ : prostaglandine H₂
PIC : pression intracrânienne
PPI : pour préparation injectable
Ppia : Peptidylpropyl isomérase A
PGs : prostaglandine(s)

PLA2 : phospholipase A₂
cPLA2 : phospholipase A₂ cytosolique
sPLA2 : phospholipase A₂ sécrétée
iPLA2 : phospholipase A₂ sécrétée indépendante du Ca²⁺
PTZ : pentylène-tétrazole

R

RAMPA : récepteur AMPA
RNMDA : récepteur NMDA
RT : réaction de transcription inverse
RT-qPCR : PCR quantitative en temps réel
Rpm : rotation par minute

S

SA : sulfate d'atropine
SNC : système nerveux central
SOCS : protéine suppressive du signal cytokinique
SOCS3 : suppressor of cytokine stimulating-3

SOD : super-oxyde dismutase
STAT : protéine transductrice du signal et activatrice de transcription

T

Tbp : *TATA box binding protein*
TBS : tampon Tris salin
TC : traumatisme crânien
TCP : thiénylcyclohexylpiperidine
TEM : lot témoin
TM : température de fusion
TNF α : facteur de nécrose tumorale α
TNFR : récepteurs au TNF
TXA2 : thromboxane A2

V

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1

Liste des Figures

Figure n° 1 : Cycle du glutamate.....	33
Figure n° 2 : Schéma d'un récepteur de type NMDA.....	38
Figure n° 3 : (a) Représentation schématique d'une sous-unité d'un récepteur AMPA ; (b) Assemblage tétramérique d'un récepteur AMPA.....	40
Figure n° 4 : Représentation schématique d'un récepteur métabotrope du glutamate.....	42
Figure n° 5 : Protocole de prise en charge de l'EME chez l'adulte proposé par Wasterlain (Wasterlain et Chen 2008).....	53
Figure n° 6 : Formule chimique du soman (Fluorure de méthyle phosphonate de pinacolyl).....	57
Figure n° 7 : Mécanisme d'inhibition de l'AChE par les OP.....	58
Figure n° 8 : Seringue auto-injectable bi-compartment Ineurop®.....	64
Figure n° 9 : Différentes morphologies des cellules microgliales en fonction de leur niveau d'activation.....	72
Figure n° 10 : Relations neurones-astrocytes-capillaires.....	75
Figure n° 11 : Variations morphologiques des astrocytes en fonction de leur niveau d'activation.....	78
Figure n° 12 : Mécanisme de fixation de l'IL-1 sur ses récepteurs.....	83
Figure n° 13 : Voie de transduction du signal de TNF α par le récepteur TNFR1.....	87
Figure n° 14 : Site d'action des phospholipases.....	98
Figure n° 15 : Biosynthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique.....	99
Figure n° 16 : Schéma simplifié des interrelations neuro-inflammatoires moléculaires et cellulaires impliquées dans un EME induit par le soman.....	107
Figure n° 17 : Infiltration du parenchyme cérébral par les GNN.....	110
Figure n° 18 : Structure moléculaire de la kétamine.....	119
Figure n° 19 : Action de la kétamine sur les récepteurs NMDA.....	123
Figure n° 20 : Synapse hippocampique glutamatergique. Fonctionnement normal, inhibition de l'AChE et mode d'action de la kétamine.....	132
Figure n° 21 : Conception des études visant à explorer les modifications des paramètres de la réponse neuro-inflammatoire dans le cerveau de la souris après intoxication par le soman.....	143
Figure n° 22 : Évolution de la perte de masse corporelle sur 7 jours après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.).....	144
Figure n° 23 : Étude des événements neurodégénératifs par marquage H&P dans l'amygdale de la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.)... 146	146
Figure n° 24 : Étude des événements neurodégénératifs par marquage H&P dans la région CA3 de la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.).....	147
Figure n° 25 : Étude des événements neurodégénératifs par marquage H&P dans le GD de la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.)... 148	148
Figure n° 26 : Score des lésions cellulaires chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.).....	149
Figure n° 27 : Étude de l'activation des cellules microgliales par marquage histochimique par la lectine GSA-IB4 chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.).....	151
Figure n° 28 : Étude de l'activation des cellules astrocytaires par marquage immunohistochimique de la protéine GFAP dans le septum et l'hippocampe de souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.).....	153
Figure n° 29 : Étude immunohistochimique de l'infiltration du parenchyme cérébral par les granulocytes neutrophiles dans l'amygdale et dans la région CA3 chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.).....	155
Figure n° 30 : Variations sur 7 j du taux relatif d'ARNm de IL-1 β , TNF α , IL-6 et SOCS3 dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.).....	158
Figure n° 31 : Variations sur 7 j du taux relatif d'ARNm de CXCL1, CCL5, ICAM-1 et VCAM-1 dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.).....	160
Figure n° 32 : Variations sur 7 jours du taux relatif d'ARNm d'enzymes de la voie des eicosanoïdes dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.).....	162

Figure n° 33 : Marquage immunohistochimique de la protéine cPLA2 α chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.)	164
Figure n° 34 : Marquage immunohistochimique de la protéine COX-2 chez la souris après pré-traitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.)	167
Figure n° 35 Marquage immunohistochimique de la protéine hPGDS chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.)	169
Figure n° 36 : Marquage immunohistochimique de la protéine mPGES-1 chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.)	170
Figure n° 37 : Variations sur 7 jours des activités enzymatiques PLA2 totale et COX totale dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.)	172
Figure n° 38 : Protocole expérimental subanesthésique (KET25/SA) appliqué au lot SOMAN/KET25/SA	203
Figure n° 39 : Protocole expérimental anesthésique (KET100/SA) appliqué au lot SOMAN/KET100/SA	204
Figure n° 40 : Protocole expérimental appliqué au lot TÉMOINS KET25	205
Figure n° 41 : Protocole expérimental appliqué au lot TÉMOINS KET100	205
Figure n° 42 : Conception des études visant à évaluer les effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires de deux combinaisons KET/SA à la suite d'un EME induit par le soman	207
Figure n° 43 : Évolution de la perte de masse corporelle dans les lots traités avec une combinaison KET/SA : SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA, en comparaison avec le lot TÉMOINS SOMAN	212
Figure n° 44 : Modifications histologiques (H&P) et immunohistochimiques (GSA et GFAP) dans la région CA3 de l'hippocampe 48 h après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.) et incidence de l'administration d'une combinaison KET/SA	216
Figure n° 45 : Évaluation des lésions cellulaires, de l'activation microgliale et de l'activation astrocytaire 48 h après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.), et de leurs modifications induites par l'administration des combinaisons KET25/SA ou KET100/SA	217
Figure n° 46 : Évaluation des dommages cellulaires observés à 7 j dans les lots TÉMOINS SOMAN, SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA	218
Figure n° 47 : Modifications histologiques (H&P) et immunohistochimiques (GSA et GFAP) dans la région CA3 de l'hippocampe 7 j après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.) et incidence de l'administration d'une combinaison KET/SA	218
Figure n° 48 : Analyse par RT-qPCR quantitative dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de l'évolution de l'expression de l'ARNm de SOCS3 induite par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg) et des modifications après traitement par une combinaison KET/SA	220
Figure n° 49 : Analyse par RT-qPCR quantitative et par analyses multiplexées (technologie Luminex™), dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de l'évolution de l'expression de l'ARNm de cytokines pro-inflammatoires et des protéines correspondantes induites par l'intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg) et de leurs modifications après traitement par deux combinaison KET/SA	221
Figure n° 50 : Analyse par RT-qPCR quantitative et par analyses multiplexées (technologie Luminex™), dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de l'évolution de l'expression de l'ARNm de chimiokines, de molécules d'adhésion et des protéines correspondantes induites par l'intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.) et de leurs modifications après traitement par deux combinaisons KET/SA	222
Figure n° 51 : Protocole expérimental appliqué aux lots, SOMAN/KET100/SA(2) et SOMAN/KET100/SA(1)	234
Figure n° 52 : Évolution de la masse corporelle exprimée en % de perte par rapport au poids initial dans les lots traités avec différentes répétitions d'une combinaison KET/SA	235
Figure n° 53 : Comparaison des dommages cellulaires observés 7 j après une intoxication par une dose convulsivante de soman et traitement par 1, 2 ou 3 administrations d'une combinaison KET100/SA	236
Figure n° 54 : Protocole expérimental appliqué au lot SOMAN/KET100/SA décalé	237
Figure n° 55 : Évolution de la masse corporelle exprimée en % de perte par rapport au poids initial après intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg) et traitement par un protocole KET100/SA modifié	238
Figure n° 56 : Comparaison des dommages cellulaires observés 7 j après intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg) et traitement par un protocole KET100/SA modifié	239
Figure n° 57 : Évaluation du bourgeonnement des fibres moussues dans le GD	243
Figure n° 58 : Microdissection cérébrale chez la souris	265
Figure n° 59 : Procédure d'extraction des ARN totaux	266
Figure n° 60 : Stratégie de dessin des amorces	270
Figure n° 61 : Plan de précoupes du cerveau suivant les axes : bregma 1,3 (a) et -1,5 mm (b)	281
Figure n° 62 : Évaluation semi-quantitative des dommages cellulaires après coloration H&P après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.) ...	289

<i>Figure n° 63 Evaluation semi-quantitative de l'activation microgliale par marquage histochimique par la GSA-IB4 après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.).....</i>	<i>291</i>
<i>Figure n° 64 : Délimitation des structures pour la quantification du marquage GFAP lors de l'analyse d'image.....</i>	<i>292</i>
<i>Figure n° 65 : Exemple de quantification du marquage de la protéine GFAP par analyse d'image dans le septum latéral.....</i>	<i>293</i>

Liste des tableaux

Tableau n° 1 : Classification des états de mal basée sur la classification des crises épileptiques.....	29
Tableau n° 2 : Fréquence des zones cérébrales lésées chez le rat après intoxication au soman (85 µg/kg).....	62
Tableau n° 3 : Évolution sur 7 jours de la réponse cellulaire centrale après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.).....	156
Tableau n° 4 : Augmentation moyenne par rapport au lot témoin de la concentration d'ARNm déterminée par RT-qPCR de cytokines pro-inflammatoires et de modulateurs de l'inflammation.....	159
Tableau n° 5 : Augmentation moyenne par rapport au lot témoin de la concentration d'ARNm déterminée par RT-qPCR de chimiokines et de molécules d'adhésion.....	160
Tableau n° 6 : Augmentation moyenne par rapport au lot témoin de la concentration d'ARNm déterminée par RT-qPCR d'enzymes de la voie des eicosanoïdes.....	162
Tableau n° 7 : Étude immunohistochimique de l'expression de différents acteurs de la voie des eicosanoïdes (cPLA2α, COX-2, hPGDS et mPGES).....	171
Tableau n° 8 : Tableau récapitulatif de la répartition des animaux dans les différents lots expérimentaux.....	211
Tableau n° 9 : Répartition des lots d'animaux visant à évaluer les effets de la combinaison KET100/AS sur le bourgeonnement des fibres moussues.....	242
Tableau n° 10 : Caractéristiques des couples d'amorces utilisés pour l'amplification des ADNc par PCR en temps réel.....	271
Tableau n° 11 : Liste des anticorps utilisés pour les détections immunohistochimiques.....	286

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement le Pharmacien en chef Frédéric DORANDEU pour m'avoir proposé ce sujet passionnant, pour avoir suivi et orienté l'avancement de ce travail, tout en me permettant de disposer d'une large autonomie au cours des différentes phases de son élaboration.

Je remercie le Pharmacien en chef Guy LALLEMENT qui, en m'accueillant en stage dans le département de Toxicologie du CRSSA au cours de mes études vétérinaires, a contribué à mon orientation professionnelle sur cette voie de la recherche.

Je remercie Alain BUISSON d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, ainsi que Mireille LERNER-NATOLI et Laurent BEZIN, pour avoir accepté de juger la qualité de l'ensemble de ce travail. Je remercie Etienne AUDINAT, Stéphane AUVIN, le Pharmacien en chef Christophe PIERARD ainsi que le Médecin en chef Damien RICARD d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. J'espère avoir l'honneur de collaborer avec eux et leurs équipes au cours des années à venir.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du groupe de Pharmacologie et toxicologie expérimentale, et en particulier Valérie BAILLE, Pierre CARPENTIER et Guy TESTYLIER pour leur aide au cours des phases d'élaboration, de réalisation des expérimentations, et pour l'analyse de leurs résultats. Merci à Claire BEAUP et Annie FOQUIN pour l'aide précieuse qu'elles m'ont apporté tout au long des expérimentations nécessaires à ce travail.

Je remercie le Médecin en chef André PEINNEQUIN pour les compétences qu'il m'a transmises dans le domaine de la biologie moléculaire.

Je remercie le Pharmacien en chef Antonia ALONZO ainsi que Mmes Josiane DENIS et Valérie LEROUX du laboratoire d'analyses biologiques.

Je tiens à remercier très sincèrement les personnes qui ont accepté de relire successivement ce document, permettant de faire diminuer progressivement son taux initialement élevé de fautes de frappe, de grammaire et d'orthographe : Laure BARBIER, Marion CLAVEL, Aurélie LEVIEUGE, Olivier MARTIN et Patrick MARTIGNE.

Enfin, j'adresse mes remerciements les plus sincères à ma famille, mes amis et tous ceux qui, par leurs témoignages de sympathie, ou par leurs soutiens appuyés, m'ont permis de faire face aux conséquences d'un accident survenu il y a quelques années. Je remercie particulièrement les personnes qui m'ont soutenu dans la reprise de mon activité professionnelle. J'adresse toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont encouragé à pratiquer à nouveau une activité sportive, et donné sans compter leur énergie et leur temps pour me faire bénéficier d'un entraînement intensif et de haut niveau. Activités professionnelles et sportives auront été déterminantes pour permettre la réussite de ce long processus de reconstruction.

A Stéphanie, pour avoir toujours été présente,

A Juliette,

Introduction générale

Les neurotoxiques organophosphorés (NOP) sont des agents chimiques de guerre qui exercent leur action toxique en inhibant les cholinestérases centrales et périphériques. Leur utilisation au cours de la guerre Iran-Irak (1980-1988), de la guerre du Golfe (1991) et à l'occasion de plusieurs attaques terroristes au Japon (1994-1995) montre qu'ils constituent à la fois une menace civile et militaire.

A côté du sarin, tabun ou du VX, le soman est le toxique le plus étudié en raison de ses effets particulièrement difficiles à contrecarrer. Selon la dose, l'exposition au soman peut provoquer une augmentation des sécrétions bronchiques, une détresse respiratoire, des troubles cardiaques et un décès rapide. L'état de mal épileptique (EME) consécutif à une intoxication par le soman est associé au développement de lésions irréversibles du tissu cérébral et à une réaction neuro-inflammatoire. Celle-ci, bien décrite dans diverses affections du SNC, et en particulier dans des modèles d'épilepsie, reste mal décrite après l'intoxication par le soman. Dans d'autres modèles d'EME, il a été montré qu'elle favorise le déclenchement et le maintien des crises, l'aggravation des lésions cellulaires associées, ainsi que le développement de l'épileptogenèse, processus qui transforme le cerveau « sain » en cerveau « épileptique ».

Après intoxication par le soman, les traitements classiques à base de benzodiazépines perdent une partie de leur efficacité après 10 à 20 min de crises. Lorsque le traitement débute au-delà de cette courte fenêtre thérapeutique, les antagonistes du récepteur NMDA ont montré leurs propriétés anticonvulsivantes et neuroprotectrices sur des modèles expérimentaux lorsqu'ils étaient administrés jusqu'à 90 min après l'intoxication. Le seul anti-NMDA disponible sous forme injectable et disposant d'une autorisation de mise sur le marché

(AMM) chez l'homme étant la kétamine, c'est cette molécule qui a retenu notre attention pour une partie de ce travail.

Le premier objectif de ce travail était donc de caractériser différents paramètres de la réponse inflammatoire centrale associée aux lésions cellulaires induites par l'EME.

Nous avons, au cours de cette étude, tenté d'établir une cartographie des modifications moléculaires et cellulaires de la réponse neuro-inflammatoire sur une période qui s'étend de 30 min à 7 j après l'intoxication

Notre second objectif était d'évaluer l'effet de l'administration de combinaisons thérapeutiques associant la kétamine et le sulfate d'atropine sur le développement des lésions cérébrales et de la réponse inflammatoire centrale. Au cours de cette étude, nous avons cherché à confirmer les effets neuroprotecteurs de ces combinaisons administrées à partir de 30 min après l'intoxication. Dans le même temps, nous avons étudié leurs effets sur l'activation gliale, l'infiltration du parenchyme cérébrale par les leucocytes circulants ainsi que sur les modifications quantitatives des ARNm et protéines de médiateurs inflammatoires.

Le présent travail comprend trois sections. Après une section A consacrée à une introduction bibliographique du cadre scientifique, les travaux expérimentaux ont été présentés dans une section B développant chacun des deux objectifs précédemment décrits. Dans cette section, une courte présentation méthodologique précède nos résultats et la discussion associée. La section C regroupe avec plus de détails les descriptions des techniques utilisées pour les travaux expérimentaux.

Publications / Communications

Ce travail a été financé par le Ministère de la Défense : contrats d'objectifs 03CO011-5 et 08CO0502 (DGA/DSP/STTC-SH, F. Dorandeu)

Articles publiés dans des revues à comité de lecture

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*

Carpentier P., Testylier G., Baille V., **Dhote F.**, Job A., Pouyatos B., Pernot F., Foquin A., Delacour C., Hamilton M., Dorandeu F. (2008). *Soman-induced seizures and related brain damage: How to treat seizures and assess their effects non-invasively ? J Med CBR Def Volume 6*

Lettre à l'éditeur

Dorandeu F., Carpentier P., **Dhote F.**, Mion G., Baille V., Testylier G., and Lallement G. (2009). *Re: Therapy against organophosphate poisoning: The importance of anticholinergic drugs with antihypertensive properties. (Toxicol. Appl. Pharmacol. 232, 351-358, 2008). Tox. Appl. Pharm., 238, 188*

Articles en préparation en vue d'une soumission dans une revue à comité de lecture

Dhote F., Peinnequin A., Carpentier P., Baille V., Delacour C., Foquin A., Lallement G. and Dorandeu, F. (2010) *Ketamine combined to atropine is neuroprotective and exerts anti-inflammatory effects on mouse brain after soman intoxication. Expected submission in Tox. Appl. Pharm.*

Chapitres d'ouvrages

Dorandeu F., Carpentier P., Baille V., **Dhote F.**, Testylier G., Pernot F., Mion G., Rüttimann M. et Lallement G. (2010). *Field treatment of soman-induced self-sustaining status epilepticus. Are ketamine and other NMDA antagonists the only options ? In Weissman et Raveh (Editeurs). The Neurochemical Consequences of Organophosphate Poisoning in the CNS. Transworld Research Network (Kerala, India), 2010, 9, 149-183.*

Communications orales internationales

Carpentier P., Baille V., Testylier G., **Dhote F.**, Foquin A., Delacour C., Dorandeu F. (2006) *Soman-induced seizures and related brain damage : How to treat them ? How to assess them non-invasively ? (27 novembre-1^{er} décembre 2006). 5th SISPAT (Singapore International Symposium on Protection against Toxic Substances), Singapour.*

Dhote F., Peinnequin A., Carpentier P., Baille V., Delacour C., Foquin A., Lallement G. and Dorandeu F. (2007) *Soman-induced neuroinflammatory reaction in mouse brain. Some effects of a combination of atropine and ketamine. 8-10 octobre 2007. Symposium OTAN, RTO-HFM, Edimbourg, United-Kingdom.*

Dorandeu F., **Dhote F.**, Testylier G., Baille V., Foquin A., Peinnequin A., et Carpentier P. (2010). *Neuroprotective efficacy of ketamine in combinations against soman*. 24/06/10, US Army Medical Defense Bioscience Review, Hunt Valley, MD, United-States.

Communications affichées

Dhote F., Peinnequin A., Carpentier P., Baille V., et Dorandeu F. (2006). *Expression cérébrale de gènes médiateurs de l'inflammation au cours de l'intoxication par le soman*. 13-14/06/06. Biennale de la recherche du Service de santé des armées, École du Val-de-Grâce, Paris, France.

Dhote F., Peinnequin A., Carpentier P., Baille V., Delacour C., Foquin A., Lallement G. et Dorandeu F. (2008). *Effets of atropine-ketamine combinations on neuro-inflammation in a murine model of soman-induced severe status epilepticus*. 1-6/06/08, US Army Medical Defense Bioscience Review, Hunt Valley, MD, United-States.

Dhote F., Peinnequin A., Carpentier P., Baille V., Delacour C., Foquin A., Lallement G. et Dorandeu F. (2008). *Soman-induced neuro-inflammatory reaction in murine brain. Some effects of a combination of atropine and ketamine*. 12-16/07/08, 6^e FENS Forum, Genève, Switzerland.

Dorandeu F., Baille V., Carpentier P., **Dhote F.**, Testylier G. et Lallement G. (2008). *La kétamine : Un composant clé pour la prise en charge médicalisée de l'état de mal épileptique au cours de l'intoxication organophosphorée ?* 13-14/06/08. 2^{ème} Biennale de la recherche du Service de santé des armées, École du Val-de-Grâce, Paris, France.

Dhote F., Peinnequin A., Carpentier P., Baille V., Delacour C., Foquin A., Lallement G. et Dorandeu F. (2008). *Réponse neuro-inflammatoire et crises épileptiques : étude de l'efficacité d'une combinaison atropine-kétamine sur un modèle murin après intoxication par le soman*. 13-14/06/08. 2^{ème} Biennale de la recherche du Service de santé des armées, École du Val-de-Grâce, Paris, France.
Lauréat du prix Dominique Dormont.

Dorandeu F., Carpentier P., **Dhote F.**, Baille V., Testylier G., Mion G., Beup C., Foquin A. et Lallement G. (2009). *Ketamine combined with atropine for the delayed medical treatment of soman-induced status-epilepticus*. 2-4/04/09. The Innsbruck Colloquium on Status Epilepticus, Innsbruck, Austria.

Dorandeu F., **Dhote F.**, Peinnequin A., Baille V., Foquin A., Beup C. et Carpentier P. (2010). *Une association Atropine-Kétamine réduit la réaction neuro-inflammatoire accompagnant un état de mal épileptique réfractaire d'origine toxique*. 11-13/11/10. 13^{èmes} Journées Françaises de l'Epilepsie, Grenoble, France

Section A – Introduction bibliographique

Chapitre I – Crises épileptiques et épilepsie

I. Mécanismes des crises d'épilepsie et de l'état de mal épileptique

I.1 Crises épileptiques et état de mal

I.1.1 Les crises d'épilepsie

Les neurones ont la capacité innée (épilepsies idiopathiques) ou acquise (épilepsies cryptogéniques et symptomatiques) de générer des décharges électriques exagérées en amplitude et en fréquence. Ces décharges sont dues non seulement à des modifications intrinsèques membranaires et à des facteurs entraînant un dysfonctionnement synaptique (modifications fonctionnelles des canaux ioniques voltage-dépendants sodiques, calciques et potassiques, modifications des récepteurs des neurotransmetteurs ou des protéines membranaires ou synaptiques impliquées dans l'équilibre ionique et des neurotransmetteurs), mais aussi au dérèglement de boucles de régulation (Gélisse et al. 2007).

Les crises d'épilepsie sont provoquées par l'hypersynchronisation et l'hyperactivation paroxystique d'un réseau de neurones cérébraux, conduisant à une activité oscillatoire synchrone et de forte amplitude. Les décharges paroxystiques peuvent avoir une origine exogène ou faire suite à la perturbation d'une activité oscillatoire physiologique (Llinas et al. 1999), principalement au sein des circuits thalamo-corticaux (Castro-Alamancos et Connors 1997). Les interconnexions réciproques au sein de ces structures entraînent des activités neuronales synchrones dans des conditions physiologiques selon l'état de veille ou au cours de certaines fonctions sensorielles ou motrices. La survenue d'oscillations pathologiques peut être secondaire à une perturbation des caractéristiques intrinsèques ou synaptiques des neurones, mais aussi à une altération des projections excitatrices ou inhibitrices vers l'une des composantes de ce réseau (Depaulis 2003).

Les crises épileptiques sont alors caractérisées selon leur mode d'initiation et de résolution, les manifestations cliniques associées et l'importance de la propagation de la

synchronisation neuronale. Le système actuel de classification des crises, élaboré par la Ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE), établit une distinction fondamentale entre les crises partielles et les crises généralisées.

I.1.2 L'état de mal épileptique

Selon l'OMS (Gastaut 1983) et le comité terminologique de la ILAE, l'état de mal épileptique (EME) est défini comme un « état caractérisé par une crise épileptique qui persiste suffisamment longtemps ou qui se répète à des intervalles suffisamment brefs pour créer une condition épileptique fixe et durable, les EME pouvant revêtir autant d'aspects sémiologiques qu'il existe de variétés de crises d'épilepsie ». Sur le plan pathogénique, les EME traduisent le débordement des facteurs physiologiques permettant d'interrompre une crise épileptique (Lowenstein et al. 1999).

La définition précédente reste toutefois imprécise dans sa terminologie et il est difficile de déterminer les critères permettant de définir l'EME : durée de crise continue, délais inter-crisis, nombre de crises successives... Le délai retenu initialement pour parler d'EME face à une crise prolongée ou se répétant sans reprise de la conscience était de 30 minutes (min). C'est donc la durée, plutôt que le type de crise, qui a initialement permis de caractériser l'EME. Cette définition était basée sur des études expérimentales et sur des considérations épidémiologiques. En effet, chez l'animal, des séquelles neuronales irréversibles apparaissent au-delà de 30 min d'activité épileptique soutenue (Mazarati et al. 1998a). Chez l'homme, des données épidémiologiques ont permis de montrer que des crises d'épilepsie durant plus de 30 min sont associées à un fort taux de mortalité (DeLorenzo et al. 1999, Lothman 1990). Plus récemment, la prise en compte de paramètres cliniques et pronostiques a conduit à une définition plus opérationnelle intégrant les états de mal convulsif généralisé (Chen et Wasterlain 2006, Lowenstein et al. 1999) : « L'état de mal généralisé

convulsif survenant chez l'adulte ou l'enfant âgé de plus de 5 ans fait référence à i) des crises continues ≥ 5 min ou ii) au moins deux crises successives sans récupération complète de la conscience sur une période d'au moins 5 min. »

Une classification des EME basée sur la classification des crises a été proposée par Gastaut en 1983 (Tableau n° 1).

Crises épileptiques	État de mal épileptique (EME)
Crises généralisées	EM généralisés
Absences	État d'absence (« petit mal status »)
Crises myocloniques	EM myoclonique
Crises cloniques	EM clonique
Crises toniques	EM tonique
Crises tonico-cloniques	EM généralisé tonico-clonique
Crises atoniques	EM atonique
Crises partielles (focales)	EM partiel
Crises partielles simples (sans altération de la conscience)	EM partiel simple (EMPS), sans altération de la conscience
- avec signes moteurs	- EMPS somatomoteur
- avec signes somatosensitifs ou sensoriels	- EMPS somatosensitif, sensoriel
- avec signes végétatifs	- EMPS végétatif
- avec signes psychiques	- EMPS à symptomatologie psychique
Crises partielles complexes (avec altération de la conscience)	EM partiel complexe (avec altération de la conscience)
Crises partielles secondairement généralisées	EM partiel secondairement généralisé
Crises non classées	EM non classés

Tableau n° 1 : Classification des états de mal basée sur la classification des crises épileptiques
D'après Gastaut (1983).

Les EME, généralisés ou partiels, peuvent aussi être subdivisés en EM convulsifs et EM non convulsifs. Les EM convulsifs, dominés par les EM généralisés tonico-cloniques (francs ou larvés), mettent régulièrement en jeu le pronostic vital.

Depuis les travaux de Meldrum (Meldrum et Horton 1973, Meldrum et al. 1973), il a été établi que la survenue de crises épileptiques, même en l'absence de signes convulsifs,

provoquait des pertes neuronales. Par ailleurs, Sloviter (Sloviter 1987) a montré que ces morts cellulaires étaient liées à des mécanismes excitotoxiques.

I.2 Neurochimie de la crise épileptique et des EME

La mise en place des crises d'épilepsie provoque de nombreuses modifications biochimiques cérébrales. La survenue d'une décharge épileptique suppose la coexistence d'une hyperexcitabilité constitutionnelle ou acquise et de l'hypersynchronie d'un groupe de neurones. Ces perturbations électrophysiologiques élémentaires résultent notamment d'un déséquilibre entre le système de neurotransmission excitateur dont les neuromédiateurs sont des acides aminés (glutamate et aspartate), et le système inhibiteur médié par l'acide γ -amino-butyrique (GABA) (Jones-Davis et Macdonald 2003). Ces phénomènes sont généralement la conséquence d'anomalies de canaux ioniques neuronaux : canaux voltages-dépendants Na^+ ou Ca^{2+} (responsables de la dépolarisation neuronale) ou K^+ et Cl^- (responsables de la repolarisation ou de l'hyperpolarisation (Engrand et Crespel 2009). La part respective de la dérégulation de ces différents mécanismes dans la pérennisation des crises conduisant à l'EME reste mal connue. Durant les premières minutes correspondant à la phase d'initiation de l'EME, les crises épileptiques peuvent être interrompues par de nombreuses médications qui augmentent le tonus inhibiteur ou réduisent le tonus excitateur (Wasterlain et al. 2002b). Lorsque l'EME est auto-entretenu, les crises ne peuvent être généralement stoppées efficacement qu'en utilisant des agents pharmacologiques qui inhibent la transmission glutamatergique (Mazarati et Wasterlain 1999, Naylor et al. 2005), alors que l'efficacité des benzodiazépines diminue au-delà de 20 à 30 min de crises (Kapur et Macdonald 1997). Ces modifications chronologiques de la réponse aux différents agents pharmacologiques s'expliquent par les modifications de canaux ioniques, la libération de neurotransmetteurs et l'action sur différents récepteurs induit par les crises épileptiques

(Wasterlain et Chen 2008). Les premières secondes sont dominées par la libération de neurotransmetteurs, l'ouverture et fermeture de canaux ioniques ainsi que par la phosphorylation et désensibilisation de récepteurs. Durant les minutes qui suivent le début des crises, il s'opère une modification de la composition en sous-unités formant les récepteurs GABA_A ainsi qu'une modification de la densité synaptique de ces récepteurs qui sont internalisés dans des endosomes (Goodkin et al. 2005, Goodkin et al. 2008, Hu et al. 2008, Naylor et al. 2005). Dans le même temps, dans les synapses excitatrices, on observe un phénomène inverse qui, par le recrutement de sous-unités des récepteurs AMPA et NMDA vers la membrane synaptique, aboutit à une augmentation de la densité des récepteurs au glutamate (Mazarati et Wasterlain 1999, Wasterlain et al. 2002a). Les élévations et les diminutions des densités respectives en récepteurs excitateurs et inhibiteurs favorisent l'augmentation de l'excitabilité neuronale. Des modifications fonctionnelles d'enzymes synaptiques telles que la phosphorylation de la calmoduline kinase II, favorisent aussi l'excitabilité neuronale en augmentant la libération de glutamate (Wasterlain et al. 1992). Par la suite, l'implication d'autres mécanismes participe à la perte progressive d'efficacité des anti-glutamatergiques au-delà de 1 à 2 h de crises. En effet, l'hyperexcitation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (RNMDA) est associée à la libération de molécules excitatrices telles que la substance P et la neurokinine B (Liu et al. 1999). Inversement, la diminution du nombre des récepteurs de la tachykinine favorise une diminution de l'hyperexcitabilité (Liu et al. 2003). Parallèlement, les systèmes anticonvulsivants endogènes tels que le système GABA (Treiman 2001), l'activation du récepteur A1 de l'adénosine (Gouder et al. 2003) ou la sécrétion de peptides neuromodulateurs tels que la dynorphine (Mazarati et al. 1999), la galanine (Mazarati et al. 1998b), la somatostatine (Kapur et Macdonald 1997, Sperk et al. 1986) ou le neuropeptide Y (Vezzani et al. 1999b) sont dépassés.

Le neurotransmetteur excitateur le plus abondant dans le système nerveux central (SNC) des mammifères est le glutamate. Le rôle exact de ce neurotransmetteur n'est pas toujours précisément connu dans les différents types d'EME qui, chez l'homme, sont dus principalement à un sevrage brutal d'antiépileptiques, ou à des pathologies cérébro-vasculaires (ischémie, traumatisme, infections...) (Neligan et Shorvon 2010). Cependant, la transmission glutamatergique jouant donc un rôle essentiel dans les EME induits par les neurotoxiques organophosphorés (NOP), différents aspects de ce neurotransmetteur ont été développés plus précisément dans le prochain paragraphe.

I.3 Le glutamate

I.3.1 Métabolisme

Le glutamate présent dans le SNC est synthétisé localement (Hertz 2006, Hertz et al. 1999). La synthèse du glutamate peut être neuronale, par transamination de l'acide α -cétoglutarique, ce qui permet l'entretien du pool de ce neurotransmetteur (Yudkoff et al. 1993). Une autre voie, exclusivement astrocytaire, permet la synthèse de ce neurotransmetteur grâce au cycle glutamate-glutamine. Une fois recapté par les astrocytes, le glutamate est aminé sous l'action de la glutamine synthétase, enzyme spécifique des astrocytes qu'on ne retrouve pas dans les neurones. La glutamine est alors captée par les neurones, hydrolysée sous l'action d'une glutaminase phosphate-dépendante, le glutamate résultant étant à nouveau stocké dans les vésicules pré-synaptiques (Kvamme et al. 2000). L'alanine et les acides aminés branchés – notamment la leucine – sont d'autres précurseurs possibles du glutamate et de la glutamine.

Les concentrations extracellulaires de glutamate sont en permanence finement régulées et son action excitatrice est rapidement neutralisée, essentiellement grâce à sa recapture par les prolongements astrocytaires qui couvrent la fente synaptique (Figure n° 1). Cette recapture

a lieu dans les zones habituellement lésées au moyen d'un système de transport d'acides aminés excitateurs spécifiques, les EAAT (*Excitatory Amino Acid Transporters*). Plusieurs types d'EAAT ont pu être isolés sur les astrocytes et sur les neurones (Danbolt et al. 1998), mais ce sont les transporteurs astrocytaires qui assurent de façon prépondérante la recapture du glutamate (Bergles et Jahr 1998, Pellerin et Magistretti 1994). Cette recapture se produit essentiellement le long d'un gradient électrochimique de Na^+ : pour chaque molécule de glutamate transportée, 3 ions Na^+ pénètrent dans l'astrocyte (Anderson et Swanson 2000, Danbolt et al. 1998) Les astrocytes peuvent ainsi réguler efficacement la concentration synaptique glutamatergique et l'efficacité de la transmission synaptique (Oliet et al. 2001). Une augmentation du nombre de ces transporteurs peut d'ailleurs protéger les neurones contre l'excitotoxicité due à une augmentation de la concentration cellulaire en glutamate (Rothstein et al. 2005).

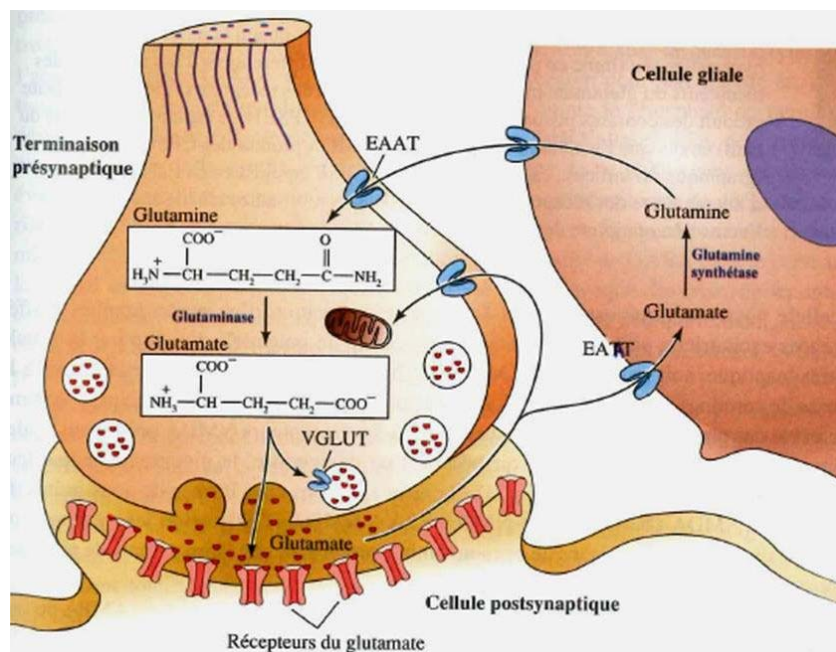


Figure n° 1 : Cycle du glutamate.
Illustration d'après Neurosciences, édition De Boeck Université.

I.3.2 Les récepteurs du glutamate

La libération du glutamate par les terminaisons synaptiques exerce des effets excitateurs via des récepteurs spécifiques ionotropes et métabotropes (Fonnum 1984).

L'activation des récepteurs du glutamate est impliquée dans de nombreux processus cellulaires : transmission synaptique, prolifération, migration neuronale, plasticité synaptique et mort cellulaire (Baskys et al. 2005, Hetman et al. 2006, Nacher et al. 2006, Uesaka et al. 2006). Le glutamate agit par fixation sur des récepteurs spécifiques de la membrane synaptique. La découverte d'agonistes naturels comme l'acide kaïnique et l'acide quisqualique, ou de synthèse comme le N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxasolepropionate (AMPA), a permis de distinguer pharmacologiquement différentes familles de récepteurs du glutamate. Les approches pharmacologiques et moléculaires ont permis de classer les récepteurs du glutamate en fonction de leurs modalités de transduction – ionotropes ou métabotropes – et de leurs caractéristiques pharmacologiques. Les récepteurs ionotropes sont des canaux ioniques multimériques, alors que les récepteurs métabotropes sont constitués de sept domaines transmembranaires agissant par l'intermédiaire des messagers intracellulaires (protéines G).

I.3.2.1 Les récepteurs ionotropes

Les récepteurs ionotropes (iGluR) ont été classés sur le plan pharmacologique en fonction de la nature du ligand qui les active. On peut distinguer les récepteurs activés par le NMDA et les récepteurs non-NMDA activés soit par l'AMPA, soit par l'acide kaïnique (KA). Il existe un autre type de récepteur non-NMDA, moins répandu : le récepteur delta.

Les iGluRs sont des récepteurs canaux transmembranaires ; ils sont perméables aux cations, principalement au Na^+ , au K^+ et, pour certains au Ca^{2+} (Burnashev et al. 1996, Magleby 2004). Ces récepteurs canaux sont des complexes tétramériques (Rosenmund et al.

1998) composés d'une combinaison de sous-unités. Toutes les sous-unités des iGluR partagent une topologie membranaire commune (Bennett et Dingledine 1995). L'organisation des segments hydrophobes dans la membrane plasmique et la tétramérisation des sous-unités permettent la formation d'un pore à travers lequel diffusent les ions. Chaque sous-unité contribue au récepteur par un site de fixation pour l'agoniste (avec des propriétés pharmacologiques spécifiques), une partie du pore, et un domaine C-terminal cytosolique qui permet des interactions avec des protéines partenaires.

1.3.2.1.1 Les récepteurs NMDA

Les récepteurs RNMDA sont principalement caractérisés par leur forte perméabilité au Ca^{2+} , qui leur confère un rôle central dans les phénomènes de plasticité synaptique, mais aussi dans les morts neuronales dans des conditions excitotoxiques pathologiques. Les RNMDA sont généralement tétramériques, composés d'une combinaison de sous-unités NR1 et de sous-unités NR2 et/ou NR3 (Paoletti et Neyton 2007) (Figure n° 2). Qu'ils soient pré- ou post-synaptiques, les RNMDA participent à l'intégration du signal exciteur. Le principal agoniste de synthèse du site de reconnaissance du glutamate (situé sur la sous-unité NR2) est le NMDA. Il montre peu de sélectivité pour les différents sous-types de RNMDA. Il n'est pas recapté ni métabolisé comme le glutamate, ce qui explique sa plus grande efficacité pharmacologique malgré une plus faible activité intrinsèque. Les autres principaux agonistes du RNMDA sont l'acide quinolinique, l'acide iboténique et l'acide aspartique.

Il existe un seul gène codant pour la sous-unité NR1, mais huit variants d'épissage qui génèrent quatre domaines C-terminaux différents. Les domaines de liaison S1/S2 de NR1 constituent le site de fixation de la glycine, un coactivateur du récepteur. Quatre gènes fortement homologues codent pour les différentes sous-unités de type NR2 : NR2A, NR2B, NR2C et NR2D. Deux gènes codent pour les sous-unités de type NR3 : NR3A et NR3B. Les

sous-unités NR2 et NR3 ne forment pas de récepteurs fonctionnels homo-oligomériques (Carroll et Zukin 2002, Cull-Candy et al. 2001).

L'assemblage des différentes sous-unités permet la formation d'une région extracellulaire, disposant de sites de fixation de l'agoniste glutamate et glycine, ainsi que de sites de fixation de modulateurs non compétitifs tels que le zinc. Dans la zone transmembranaire, il se forme un canal ionique sur lequel peuvent se fixer, de manière non compétitive, différents « bloqueurs » du canal ionique, tel que le Mg^{2+} , le MK-801, la kétamine ou la mémantine (Paoletti et Neyton 2007). L'ouverture du canal des RNMDA nécessite la fixation simultanée de la glycine sur la sous-unité NR1 ou NR3, et du glutamate sur une des sous-unités NR2 (Chen et Wyllie 2006). L'affinité des RNMDA pour les composés susceptibles de bloquer le pore ionique, et donc la perméabilité ionique, varie en fonction des différentes sous-unités NR qui composent le récepteur. C'est le cas pour le MK-801 dont l'affinité, et donc l'efficacité inhibitrice, est 10 fois plus importante pour les récepteurs NR1/NR2A et NR1/NR2B que pour les récepteurs NR1/NR2C et NR1/NR2D. Il n'existe cependant que peu de différence de sensibilité entre les différentes sous-unités NR pour la phéncyclidine (PCP), la thiénylcyclohexylpipéridine (TCP), la kétamine ou la mémantine (Paoletti et Neyton 2007).

Au potentiel de repos du neurone (-80 mV), la liaison du glutamate sur le récepteur de type NMDA ne suffit pas pour permettre l'entrée d'ions par le canal. Une dépolarisation importante de la membrane plasmique, aux alentours de -40 mV, est nécessaire pour lever le blocage du canal par l'ion magnésium (Nowak et al. 1984). Ainsi, c'est seulement après la dépolarisation de la cellule par le biais d'une activation d'autres canaux excitateurs glutamatergiques non-NMDA, tels que les récepteurs AMPA ou kaïnate, que les canaux NMDA libèrent le Mg^{2+} , permettant l'influx de calcium dans la cellule et conduisant à un « cercle vicieux » excitotoxique (Borris et al. 2000, Fountain et Lothman 1995).

Il existe une grande hétérogénéité des récepteurs NMDA dans les différents types de cellules nerveuses. Ces différences portent sur leur localisation, la densité de récepteurs, ou la composition en sous-unités des récepteurs.

Les principaux RNMDA de surface sont post-synaptiques et répondent à la libération du glutamate par les vésicules pré-synaptiques. Les RNMDA pré-synaptiques participent à la modulation de l'activité pré-synaptique. Les RNMDA péri-synaptiques sont activés dans les mêmes conditions, mais uniquement lors d'intenses stimulations synaptiques. Les RNMDA extra-synaptiques, présents en moins forte densité, ne sont probablement pas activés par la libération synaptique de glutamate, mais peuvent être activés par des sources de glutamate exogènes (Groc et al. 2009).

Les RNMDA post-synaptiques sont regroupés en structures macromoléculaires appelées *postsynaptic density* (PSD), qui relie le RNMDA à des kinases, phosphatases, ainsi qu'à d'autres protéines transductrices du signal et aux récepteurs métabotropes du groupe 1 (Lau et Zukin 2007).

Le nombre et la composition des RNMDA ne sont pas fixes, ceux-ci étant susceptibles de subir d'importants remaniements en réponse aux variations de l'activité synaptique neuronale. Ces changements peuvent s'opérer par des phénomènes d'internalisation et d'externalisation des récepteurs, par une modification de leur composition en différentes sous-unités et par une mobilité membranaire entre les sites synaptiques et extra-synaptiques. Ces mécanismes permettent une modulation importante de l'efficacité synaptique (Lau et Zukin 2007).

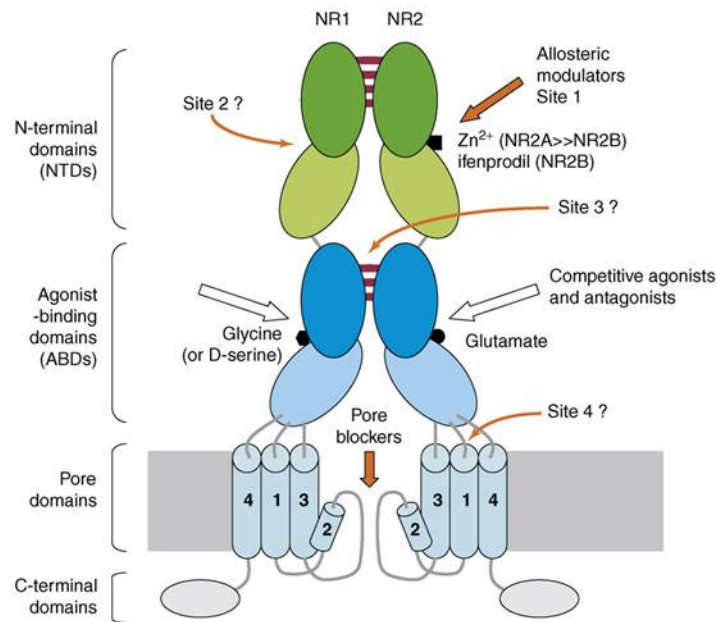


Figure n° 2 : Schéma d'un récepteur de type NMDA.
Illustration d'après Paoletti et Neyton (2007).

1.3.2.1.2 Les récepteurs non-NMDA

- Les récepteurs AMPA

Les récepteurs de type AMPA (RAMPA) sont les acteurs majeurs de la transmission synaptique rapide. Quatre gènes codent pour les sous-unités des récepteurs du glutamate de type AMPA : GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4 (Figure n° 3-a). La majorité des RAMPA est composée d'une combinaison de la sous-unité GluR2 avec une sous-unité GluR1 ou GluR3 (Figure n° 3-b). La sous-unité GluR4 est exprimée dans des populations cellulaires spécifiques localisées dans des régions telles que thalamus et le cervelet (Martin et al. 1993, Spreafico et al. 1994).

Les canaux activés par l'AMPA sont principalement perméables au Na^+ , mais aussi au Ca^{2+} avec des propriétés de cinétique et de conductance dépendant de leur composition en sous-unités (Jonas 1993). Les différents domaines C-terminaux générés par l'épissage alternatif sont autant de signaux peptidiques qui permettent l'interaction avec des protéines partenaires ou la phosphorylation des récepteurs (Luscher et Frerking 2001, Song et Huganir

2002). La phosphorylation des domaines C-terminaux des différentes sous-unités permet une régulation importante de la perméabilité des RAMPs (Carvalho et al. 2000) et du trafic de ces récepteurs (Santos et al. 2009).

Comme pour les RNMDA, la distribution subcellulaire et les interactions protéiques des RAMPs sont des éléments essentiels à la régulation fine de la transmission synaptique par le glutamate. Il existe une régulation qualitative et quantitative des RAMPs. Elle passe par i) la mobilité membranaire des RAMPs qui permet une modulation de leur concentration synaptique et extra-synaptique, ii) un contrôle de l'exocytose des différentes sous-unités et iii) des mécanismes d'internalisation des récepteurs (Santos et al. 2009). La grande majorité des cellules du SNC adulte exprime des récepteurs contenant la sous-unité GluR2. Cette sous-unité joue un rôle prédominant dans la perméabilité au Ca^{2+} du canal ionique associé, car seuls les RAMPs qui ne disposent pas de cette sous-unité laissent entrer le Ca^{2+} (Geiger et al. 1995, Hollmann et al. 1991).

Des modifications de l'ARNm codant pour cette sous-unité ou de l'expression relative de cette sous-unité GluR2 ont été mises en évidence à la suite d'EME (Chapman et Meldrum 2006, Tanaka et al. 2000). Dans un modèle murin d'épilepsie faisant appel à une injection intrahippocampique d'acide kaïnique, une augmentation de l'immunoréactivité de la sous-unité GluR2 a été observée dans les cellulaires granulaires du gyrus denté (GD) (Suzuki et al. 2000).

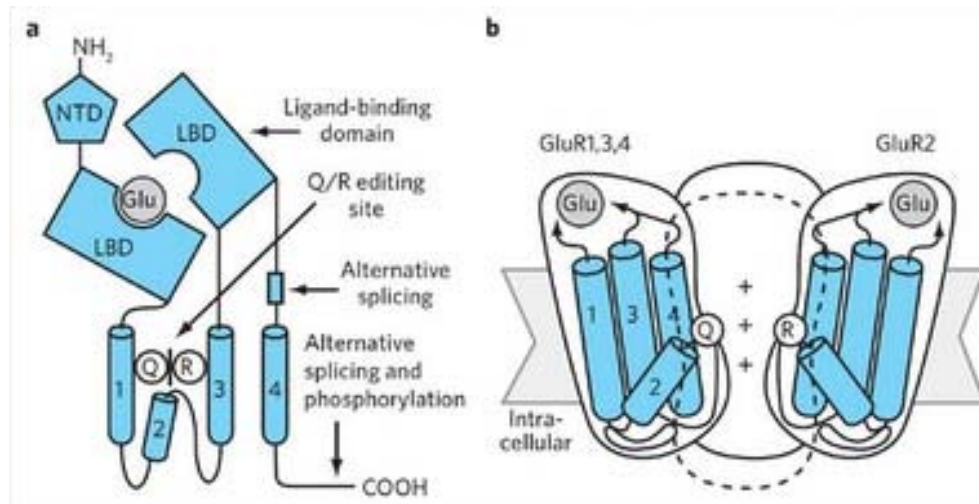


Figure n° 3 : (a) Représentation schématique d'une sous-unité d'un récepteur AMPA ; (b) Assemblage tétramérique d'un récepteur AMPA.

Illustration d'après (Fleming et England 2010).

- Les récepteurs kaïnate

Les récepteurs kaïnate (KAR) sont fortement exprimés dans le SNC et sont impliqués dans de nombreuses fonctions (Pinheiro et Mulle 2006). Il existe 5 sous-unités : GluK1 à 5, qui s'assemblent dans des combinaisons variables pour former les récepteurs fonctionnels (Jane et al. 2009).

Comme pour les RAMPA, les ARNm des sous-unités des KAR peuvent subir des modifications post-transcriptionnelles ou des épissages alternatifs. Ces modifications forment des variants dotés de propriétés pharmacologiques différentes (perméabilité au Ca^{2+}), et permettent une régulation fine du trafic des KAR et de leurs interactions avec les autres composants de la membrane (Coussen et al. 2005).

Les récepteurs tétramériques ont une structure proche de celle des autres récepteurs ionotropiques du glutamate. Les cellules des différentes régions cérébrales expriment des KAR dont la composition en différentes sous-unités est variable, ce qui leur confère des propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques différentes (Wilding et Huettner 2001). Tout comme les RAMPA, les KAR forment des canaux perméables aux cations. Ils sont

activés par de faibles concentrations de kaïnate, et possèdent des propriétés d'activation et de désensibilisation rapide en présence de glutamate. Ils peuvent être médiateurs de la réponse synaptique, modulateurs de la libération du neurotransmetteur ou encore régulateurs de l'excitabilité neuronale (Pinheiro et Mulle 2006).

Les KAR jouent un rôle dans l'excitotoxicité associée à l'épilepsie. Il semblerait que ce phénomène soit lié à l'activation de la c-Jun N-terminal kinase (JNK3) par la sous-unité GluK2 composant certains KAR. L'association GluK2/PSD-95 semble intervenir dans les mécanismes de mort cellulaire en permettant l'activation de la JNK3 (Vincent et Mulle 2009).

1.3.2.2 Les récepteurs métabotropes

Les récepteurs métabotropes du glutamate (mGluRs) sont des protéines transmembranaires avec sept segments hydrophobes couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG). Les mGluRs sont classés en trois groupes en fonction de leur homologie de séquence, de leur pharmacologie et de la voie de transduction à laquelle ils sont couplés (Niswender et Conn 2010). Le groupe 1 comprend les récepteurs mGluR1 et mGluR5 : ils sont couplés positivement à la phospholipase C. Le groupe 2 inclut les récepteurs mGluR2 et mGluR3, et le groupe 3 les récepteurs mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. La caractéristique structurale des mGluR est la présence du site de fixation du ligand dans un large domaine N-terminal extracellulaire, lié par un domaine riche en cystéines au domaine heptahélice (région transmembranaire formée de sept hélices) (Jaskolski 2004) (Figure n° 4). Fonctionnellement, les mGluRs régulent et participent à la transmission synaptique par le biais de divers effecteurs comme la protéine kinase C (PKC), les récepteurs à l'inositol-triphosphate, ou des canaux ioniques membranaires. Les mGluRs des groupes 2 et 3 modulent la libération de neurotransmetteurs en agissant comme autorécepteurs pré-synaptiques de manière homo ou hétéro-synaptique, alors que les mGluRs du groupe 1 sont principalement

post-synaptiques (Coutinho et Knopfel 2002). Les récepteurs métabotropes sont impliqués dans une grande diversité de processus normaux et pathologiques, diversité que l'on retrouve dans leur localisation autour de la synapse glutamatergique et sur les cellules gliales.

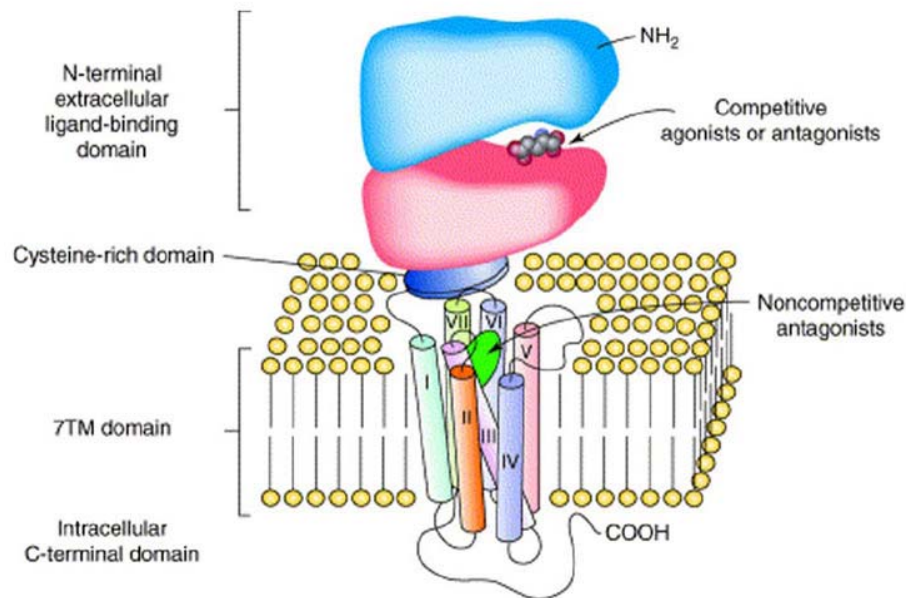


Figure n° 4 : Représentation schématique d'un récepteur métabotrope du glutamate.
Le domaine liant le glutamate se trouve dans le domaine N-terminal, il est suivi du domaine heptahélice et du domaine C-terminal cytosolique. Illustration d'après Jaskolski (2004).

I.3.3 Rôle des récepteurs au glutamate dans la pérennisation des crises

La survenue des crises d'épilepsie provoque, rapidement après leur initiation, une modification importante de la composition synaptique en récepteurs excitateurs ou inhibiteurs, modifiant ainsi de façon déterminante l'excitabilité neuronale.

Un mécanisme d'internalisation des récepteurs GABA_A de la membrane synaptique vers l'intérieur de la cellule a été mis en évidence (Naylor et al. 2005). Une modification de la composition des récepteurs GABA_A dans leurs différentes sous-unités affecte principalement les sous-unités $\gamma 2$, α et β (Mazarati et Sankar 2006). Ces différents phénomènes permettent d'expliquer la perte d'efficacité progressive des benzodiazépines après une certaine durée de crises (Mazarati et al. 1998a).

Simultanément, des sous-unités des récepteurs AMPA et NMDA passent par exocytose vers la membrane synaptique, permettant la formation de récepteurs fonctionnels supplémentaires (Chen et Wasterlain 2006). Ces modifications accentuent l'excitabilité neuronale, favorisant le passage des crises isolées vers l'EME.

La mise en place d'une réponse neuro-inflammatoire, au travers de la production de composés tels que certaines cytokines et prostaglandines, est susceptible d'augmenter la sensibilité des récepteurs du glutamate (Vezzani et al. 2002), favorisant la récurrence des crises d'épilepsie et l'épileptogénèse.

II. Conséquences pathologiques des crises épileptiques et des EME

Les conséquences cérébrales et systémiques de l'EME sont plus importantes en cas d'EME convulsif associé à des crises tonico-cloniques généralisées, qu'en cas d'EME non convulsif (Chapman et al. 2001, Engrand et Crespel 2009).

II.1 Répercussions cérébrales directes de l'EME : excitotoxicité et mort neuronale

L'existence de morts neuronales dans les régions riches en récepteurs du glutamate (Wasterlain et al. 1993), même en l'absence d'activité convulsive ou malgré le contrôle des paramètres hémodynamiques, ventilatoires et convulsifs (Meldrum et al. 1973), a permis de montrer que les morts neuronales étaient liées à des mécanismes excitotoxiques causés par la libération excessive de glutamate.

La stimulation soutenue des récepteurs NMDA provoque une levée du blocage magnésien des récepteurs NMDA, permettant une importante augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire (Pal et al. 1999). L'afflux excessif de Ca^{2+} intracellulaire provoque l'activation en cascade d'enzymes calcium-dépendantes, parmi lesquelles des

protéases (Araujo et al. 2005) ou des phospholipases, ce qui conduit à des dommages directs des membranes et des organites ainsi qu'à une altération du métabolisme cellulaire. L'augmentation de Ca^{2+} dans les mitochondries inhibe leur fonctionnement, bloque la production d'énergie et favorise la formation de radicaux libres (Cock et al. 2002). L'activation de la NO-synthase neuronale (Pal et al. 1999) et l'augmentation du taux de radicaux libres oxygénés participent à la mort cellulaire (Fujikawa et al. 2000, Wasterlain et al. 1993). L'ensemble de ces phénomènes peut entraîner un rétrocontrôle positif favorisant une augmentation accrue de l'afflux de Ca^{2+} intracellulaire, responsable d'une aggravation des dysfonctionnements métaboliques et des morts cellulaires (Arundine et Tymianski 2003, Fujikawa 2005).

L'EME entraîne des pertes neuronales sélectives dans les régions les plus vulnérables du cerveau (Meldrum 2007). Chez l'homme, plusieurs études *post-mortem* ont montré que les lésions cérébrales intéressent principalement le système limbique, le thalamus, les cellules de Purkinje du cervelet et le cortex cérébral (Corsellis et Bruton 1983).

II.2 Conséquences systémiques et retentissement cérébral secondaire

Le relargage massif de catécholamines est associé à une hyperactivité musculaire et à une augmentation majeure du métabolisme général et cérébral. On constate une tachycardie, une hypertension artérielle, une augmentation de la fréquence respiratoire, ainsi qu'une augmentation de la glycémie et une acidose sanguine liée à la production de lactate (Aminoff et Simon 1980). Dans un certain nombre de cas, des déficiences cardiorespiratoires sont associées à une arythmie cardiaque (Boggs et al. 1993), une hypotension, un œdème pulmonaire (Simon 1985) et apnée (Aminoff et Simon 1980). Une hyperthermie, liée à la libération importante de catécholamines et à l'hyperactivité musculaire, apparaît dans 80 % des cas d'EME. Elle peut être responsable d'une aggravation des dommages cérébraux (Liu et

al. 1993). Une hypoglycémie secondaire à l'épuisement des réserves de glycogène et à la sécrétion d'insuline est parfois mise en évidence (Benowitz et al. 1986, Meldrum 1983, Meldrum et Horton 1973). Par ailleurs, un œdème cérébral et une augmentation de la pression intracrânienne (PIC) peuvent être constatés au-delà de 30 min d'EME. D'autres complications systémiques très diverses sont parfois observées. Elles incluent des phénomènes de rhabdomyolyse, insuffisance rénale aiguë, pancréatite, coagulation intravasculaire disséminée, fractures et nécrose hépatique (Finney et Hirsch 2005).

L'hypertension artérielle et l'augmentation initiale du débit sanguin cérébral permettent de répondre à l'augmentation franche du métabolisme général et cérébral. Par la suite, un phénomène de décompensation conduit à une diminution de la perfusion cérébrale causée par i) la dégradation de l'hémodynamique systémique et ii) l'augmentation de la pression intracrânienne (PIC) (Ichai et al. 1996). L'inadéquation entre les besoins et les apports énergétiques, l'hypoxie, l'hypoglycémie, ainsi que la diminution de perfusion cérébrale favorisent l'ischémie neuronale (Engrand et Crespel 2009). Le déficit énergétique qui en découle est susceptible d'aggraver la cascade cytotoxique et les lésions neuronales (Wasterlain et al. 1993). L'intensité des lésions semble être corrélée à la durée de l'EME et au degré d'hyperthermie (Fountain et Lothman 1995) et semble par ailleurs majorée lorsque l'EME survient dans un contexte inflammatoire (Sankar et al. 2007).

II.3 Épileptogenèse

Il s'agit d'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 ». L'épileptogenèse peut être déclenchée par différentes atteintes cérébrales telles qu'un traumatisme crânien, une ischémie

cérébrale ou un épisode d'EME. L'épileptogenèse susceptible de se développer après l'EME provoqué par l'intoxication aux NOP est encore mal connue. Comme pour les autres phénomènes d'épileptogenèse, l'ensemble des hypothèses détaillées ci-dessous permet d'expliquer le développement de ces crises épileptiques spontanées, différées du phénomène initiateur.

- Les pertes neuronales : dans les différents modèles animaux d'épileptogenèse, les phénomènes de perte neuronale les mieux décrits concernent la neurodégénérescence et la perte cellulaire sélective qui a lieu dans le hile et la couche pyramidale des cellules de l'hippocampe. L'épileptogenèse ne semble toutefois pas être liée uniquement à des pertes neuronales, mais aussi à des modifications fonctionnelles dont la nature exacte reste inconnue. Cependant, ces pertes neuronales stimulent la réorganisation anormale des circuits hippocampiques, ce qui pourrait expliquer partiellement l'augmentation de l'excitabilité de cette structure et ses possibilités de synchronisation.
- La réorganisation synaptique : on constate dans certains modèles animaux d'EME une dispersion des cellules granulaires du gyrus denté (GD), ainsi qu'un bourgeonnement de leurs axones (fibres moussues). L'existence de ces deux phénomènes a été démontrée dans de nombreux modèles animaux conduisant à un état de mal ou à des crises partielles sans généralisation (Bouilleret et al. 1999, Pitkanen et al. 2007, Suzuki et al. 2005). Il existe cependant certaines situations dans lesquelles cette plasticité synaptique en réponse aux processus neurodégénératifs dans l'hippocampe n'est pas présente ou n'a pas de rôle majeur dans le processus d'épileptogenèse (Mohapel et al. 2000).
- La neurogenèse : ce terme désigne la capacité de certaines cellules du cerveau embryonnaire ou adulte de se multiplier, de migrer et de se différencier en donnant naissance à des neurones (Rakic 1998). Une augmentation de la prolifération des cellules souches

localisées dans la zone sous-granulaire du GD a été observée après intoxication par le soman (Collombet et al. 2005). Cette augmentation de la prolifération neuronale précoce, mais transitoire, a été mise en évidence dans différents modèles expérimentaux d'épilepsie (acide kaïnique, pilocarpine, traumatisme crânien, AVC) (Kernie et Parent 2010, Parent et al. 1997, Pitkanen et McIntosh 2006). Les nouveaux neurones possédant une localisation aberrante, une connectivité modifiée et une excitabilité majorée (Parent et Murphy 2008, Zhao et Overstreet-Wadiche 2008) pourraient contribuer à l'excitabilité majorée de l'hippocampe et à la récurrence des crises. La prolifération des progéniteurs neuronaux génère des neurones mais aussi des astrocytes (Heinrich et al. 2006) dont le devenir dépend des facteurs environnementaux, et en particulier de facteurs inflammatoires (Ek Dahl et al. 2009). Dans le cas de l'EMLT, les progéniteurs restent à l'état d'astroglie immature (Crespel et al. 2005, Siebzehnrubl et Blumcke 2008).

- La perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) : une augmentation de la vascularisation dans l'hippocampe a été mise en évidence chez des malades souffrant d'épilepsie du lobe temporal, ainsi que dans un modèle animal d'épilepsie par administration de lithium-pilocarpine. Ce phénomène d'angiogenèse semble associé à l'augmentation de la perméabilité de la BHE, qui peut conduire à un passage accru de molécules favorisant le développement de mécanismes inflammatoires dans le SNC et une augmentation de l'excitabilité neuronale (Rigau et al. 2007).

- La gliose réactionnelle : au cours du processus d'épileptogénèse, on constate une forte augmentation de la réactivité gliale. Celle-ci se caractérise par une augmentation du nombre et de la taille des astrocytes et par une augmentation du nombre, des changements de morphologie et de fonctions des cellules microgliales (Streit et al. 1999). Les astrocytes communiquent activement avec les neurones. Ils sont capables de sécréter du glutamate, susceptible d'influencer fortement la transmission synaptique neuronale (Jourdain et al.

2007). Ce phénomène pourrait participer au processus de synchronisation neuronale, via l'action du glutamate astrocytaire sur les récepteurs NMDA extrasynaptiques (Fellin et al. 2004). Un rôle majeur des astrocytes est le maintien de l'homéostasie ionique, de la concentration extracellulaire de glutamate et le contrôle des flux aqueux au sein du compartiment extracellulaire. Au sein du foyer épileptique, les astrocytes réactifs perdent leur pouvoir tampon vis à vis du glutamate et du K^+ , conduisant à des variations de leurs concentrations extracellulaires susceptibles de participer à la synchronisation des activités neuronales (David et al. 2009, Wetherington et al. 2008). Enfin, le syncytium créé par les jonctions non-synaptiques entre les astrocytes activés pourrait contribuer à la synchronisation des neurones distants, non nécessairement connectés entre eux par des synapses (Rouach et al. 2008). Les cellules gliales interviennent également dans la réaction neuro-inflammatoire en synthétisant certains médiateurs de l'inflammation et en réagissant à leur présence.

- Les modifications inflammatoires : le développement d'une réponse inflammatoire a été mis en évidence dans différents modèles d'EME. En particulier, l'augmentation de l'ARNm de cytokines pro-inflammatoires a été détectée chez le rat après intoxication par le soman (Williams et al. 2003). Dans un modèle d'EME induit par stimulation électrique de l'hippocampe chez le rat immature, ne conduisant pas au développement de lésions neuronales (Mazarati et al. 2007), l'inflammation systémique due à l'administration de LPS favorise le développement d'une épileptogenèse (Auvin et al. 2010). Quels que soient les modèles étudiés, il est généralement difficile de préciser si les phénomènes neuro-inflammatoires observés sont une des causes ou la simple conséquence de l'épilepsie. Cependant, on peut remarquer que de nombreux acteurs de la neuro-inflammation (IL-1 β , TNF α , espèces réactives de l'oxygène...) sont capables de modifier le métabolisme du glutamate ou d'interagir avec ses récepteurs. Ces éléments, ainsi que les propriétés anti-convulsivantes de certains anti-inflammatoires ou d'inhibiteurs de cytokines

inflammatoires, suggèrent que l'inflammation pourrait participer à la pathogenèse de différentes formes d'épilepsies d'étiologies différentes (Ravizza et al. 2008). Le rôle des différents médiateurs de l'inflammation et des cellules résidentes du SNC sera développé dans le chapitre III.

III. Traitements de la crise d'épilepsie, de l'EME, et de l'EME réfractaire

III.1 Traitement des crises d'épilepsie

Les deux impératifs du traitement antiépileptique sont le contrôle complet des crises et la limitation des effets indésirables. Les caractéristiques de l'antiépileptique idéal sont bien identifiées : rapport efficacité/tolérance élevé, absorption rapide et totale après prise orale, relation linéaire dose/taux plasmatique, faible liaison avec les protéines, grand volume de distribution, petit volume d'élimination, absence de métabolites actifs, absence de pouvoir inducteur hépatique, demi-vie longue autorisant une prise unique quotidienne, disponibilité d'une forme injectable (Baulac 2002, Baulac et al. 1997). Aucun des médicaments actuellement disponibles ne réunit l'ensemble de ces critères.

Si les modes de fonctionnement de certaines molécules restent mal connus, les mécanismes d'action des antiépileptiques sont variés et comprennent, entre autres :

- une augmentation de l'action inhibitrice du GABA par l'action agoniste sur le récepteur ionophore-chlore $GABA_A$ (benzodiazépines, phénobarbital, topiramate), par inhibition de la dégradation (vigabatrin) ou par inhibition de la recapture du GABA (tigabine, valproate) ;

- un effet stabilisateur des membranes cellulaires par blocage des canaux sodium voltage-dépendants (phénytoïne, carbamazépine, oxcarbazépine, felbamate, topiramate, zonisamide, lamotrigine) ;

- un blocage des canaux calciques voltage-dépendants de type T (barbituriques, lamotrigine, ethosuximide) ;

- un blocage des canaux potassium voltage-dépendants (ethosuximide, pregabaline) ;

- une inhibition de la libération d'acides aminés excitateurs, glutamate et aspartate (lamotrigine, gabapentine) ;

- un blocage du récepteur NMDA (mémantine, kétamine) ;
- un blocage des récepteurs au glutamate de type kaïnate/AMPA (phénobarbital, topiramate, felbamate).

Les choix thérapeutiques dépendent étroitement d'une évaluation diagnostique précise du type de crises et, si possible, du type de syndrome épileptique en cause.

III.2 Traitement de l'EME

Les EME convulsifs généralisés sont des urgences thérapeutiques fréquentes et graves. La mortalité, définie comme le décès survenant dans les 30 jours après le début de l'EME, présente de grandes amplitudes selon les études, variant de 7,6 % dans une étude suisse (Coeytaux et al. 2000) à 39 % dans une étude italienne (Vignatelli et al. 2003). La mortalité, plus importante chez le patient âgé, est estimée jusqu'à 53,9 % au-delà de l'âge de 60 ans (Coeytaux et al. 2000). Cette variation entre les études est principalement due à la prise en compte ou non des états post-anoxiques et aux différences de prise en charge initiale (Dupont et Crespel 2009).

L'objectif de la prise en charge des EME convulsifs généralisés est de prévenir la survenue de dommages neuronaux ultérieurs liés aux crises épileptiques ou à un défaut d'oxygénation cérébrale lié aux complications systémiques.

La prise en charge non spécifique d'un patient en EME repose sur le maintien des fonctions vitales grâce à une réanimation essentiellement symptomatique (Engrand et al. 2009) qui doit être initiée avant le transfert hospitalier (Chen et Wasterlain 2006). La réanimation respiratoire passe par le maintien de la perméabilité des voies aériennes, une oxygénation, éventuellement par le biais d'une intubation et ventilation mécanique. D'une manière générale, la réanimation hydroélectrique est simplement réalisée par perfusion de solutés isotoniques, et par correction éventuelle des déficits en Na^+ et Ca^{2+} . La pression

artérielle est monitorée afin de détecter une éventuelle hypotension liée aux traitements spécifiques de l'EME (phénitoïne, anesthésiques...) ou à une défaillance cardiaque, conséquence de l'EME. La correction de l'hypotension nécessite la plupart du temps l'utilisation d'adrénaline ou noradrénaline (Bleck 2007). Il est indispensable de lutter contre une éventuelle hyperthermie susceptible de majorer les lésions neuronales (Walker 2007). La glycémie doit être contrôlée et corrigée par un apport de glucose ou l'administration d'insuline, pour éviter une hypoglycémie ou une hyperglycémie qui pourraient dans les deux cas aggraver ces lésions neuronales.

Le traitement médicamenteux visant à lutter spécifiquement contre les crises inclut des antiépileptiques ou des agents anesthésiques. L'EME, particulièrement dans sa forme généralisée convulsive, devient d'autant plus résistant au traitement que cet état se prolonge dans le temps (Fountain et Lothman 1995, Treiman 1999). Cette résistance au traitement pharmacologique peut être la conséquence d'une inefficacité progressive de l'inhibition par le système GABA en raison de l'internalisation des récepteurs (Meldrum 2007, Sperk 2007) et d'une activation des récepteurs au glutamate, en particulier des récepteurs NMDA. La stratégie de prise en charge d'urgence des EME est donc graduelle, faisant intervenir plusieurs lignes de traitement, afin de contrôler les crises le plus rapidement possible.

La prise en charge initiale du patient, entre 5 et 30 min après le début des convulsions, repose sur l'administration d'une benzodiazépine (clonazépam de préférence) la plus rapide possible (voie intrarectale, bolus intraveineux ou voie intraveineuse lente). En cas de persistance des convulsions, on procède à une 2^e injection intraveineuse lente de la même benzodiazépine, associée à un autre médicament antiépileptique (phénitoïne, phosphénitoïne). Cette association est administrée en première intention ou si le patient est pris en charge plus de 30 min après le début des convulsions. Le traitement peut être poursuivi par l'administration de pentobarbital s'il n'a pas été utilisé en première intention. En l'absence de

contrôle des crises, l'EME devenant réfractaire (EMER) aux traitements de première intention, la prise en charge repose alors sur l'anesthésie générale par thiopental, midazolam ou propofol. Dans ce cas, le patient est ventilé artificiellement et doit être monitoré par des électroencéphalogrammes (EEG) répétés ou par un enregistrement EEG continu (Outin 2009). Le valproate peut être utilisé dans les situations où l'anesthésie générale est difficile (Clair et al. 2009, Outin 2009). Le lévétiracétam, rendu récemment disponible par voie injectable, était jusqu'alors utilisable seulement en complément par sonde gastrique (Patel et al. 2006).

La Figure n° 5 indique le schéma thérapeutique graduel de prise en charge d'un patient souffrant d'EME préconisé par Wasterlain (Wasterlain et Chen 2008), très proche du protocole généralement appliqué en France. On remarque qu'à la place du diazépam, il est préférentiellement fait usage du clonazépam (Rivotril®) dont la durée d'action est plus longue (Outin et al. 2009).

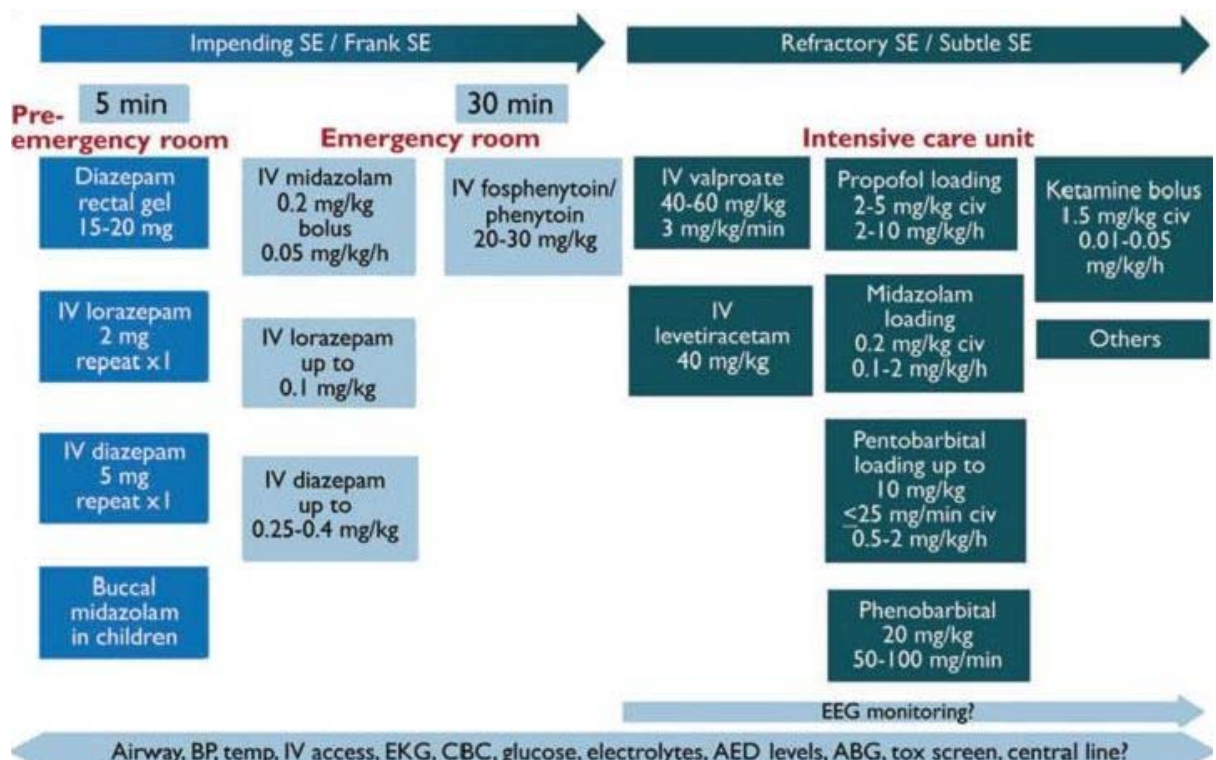


Figure n° 5 : Protocole de prise en charge de l'EME chez l'adulte proposé par Wasterlain (Wasterlain et Chen 2008).

Il existe des EMER qui résistent à un premier traitement anesthésique. Un certain nombre de médications ont été validées comme traitement de 3^e ligne sur ces EME « super-réfractaires » ou malins. Parmi ces composés, un certain nombre agit en bloquant les effets du glutamate sur ses récepteurs. La kétamine, qui possède une activité inhibitrice des RNMDA, a montré son efficacité pour traiter les EMER, rebelles aux traitements anesthésiques habituels, à la dose de 2 mg/kg suivie d'une perfusion jusqu'à 7,5 mg/kg par heure (Sheth et Gidal 1998). D'autres antiépileptiques de nouvelle génération ayant un effet sur les récepteurs du glutamate ont montré un effet bénéfique dans le traitement des EMER. C'est le cas du topiramate : outre son action modulant les canaux calciques et sodiques, ainsi que les récepteurs GABA, il exerce également une inhibition sur les canaux kaïnates et AMPA (Stafstrom 2010, Towne et al. 2003).

La kétamine, qui est déjà utilisée en traitement de 3^e ligne des EMER, constitue donc une piste thérapeutique intéressante pour le traitement de l'EME induit par les NOP (Dorandeu et al. 2003, Dorandeu et al. 2010, Mion et al. 2003). Nous consacrerons un chapitre particulier à cette molécule (Chapitre IV).

Chapitre II – L'intoxication par les neurotoxiques organophosphorés

L'intoxication par le soman conduit au développement d'un EME partiel complexe secondairement généralisé.

I. Mécanismes d'action

Les neurotoxiques organophosphorés (NOP) tels que le soman (Figure n° 6), le tabun, le sarin, le GF et le VX sont des dérivés des acides phosphorique ou phosphonique caractérisés par leur puissante action inhibitrice des cholinestérases (ChE). L'atome de phosphore de la molécule de NOP se fixe sur le groupement nucléophile du résidu sérine du site actif de l'acétylcholinestérase (AChE). La sérine du site actif est alors phosphylée (phosphorylée ou phosphonylée) irréversiblement (formation d'un conjugué enzyme-NOP) et n'est plus fonctionnelle sous cette forme (Figure n° 7). L'hydrolyse spontanée de la liaison avec le NOP n'est généralement pas observée. Des composés fortement nucléophiles comme les oximes peuvent réagir chimiquement avec le NOP en rompant le complexe NOP-enzyme et en éliminant le groupement phosphyl du site actif. Toutefois, une désalkylation du NOP peut entraîner des modifications structurales empêchant toute réactivation spontanée ou provoquée par les oximes. C'est le phénomène de vieillissement, particulièrement rapide pour le soman.

Très liposoluble, le soman traverse facilement les membranes cellulaires et pénètre rapidement dans le système nerveux central (SNC) en franchissant la BHE.

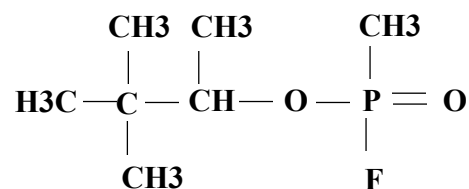


Figure n° 6 : Formule chimique du soman (Fluorure de méthyle phosphonate de pinacoyl).

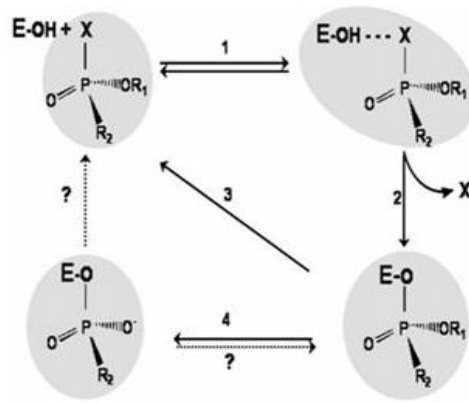


Figure n° 7 : Mécanisme d'inhibition de l'AChE par les OP.

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 phosphorylé 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). Illustration d'après Masson et Rochu 2009.

II. Modifications neurochimiques au cours de l'intoxication par le soman

Après inhibition de l'AChE, l'acétylcholine (ACh) s'accumule dans la fente synaptique dans le SNC et le système nerveux périphérique (SNP). L'état d'hypercholinergie généralisée conduit à une stimulation exacerbée des récepteurs cholinergiques muscariniques et nicotiniques. Au niveau périphérique, cette stimulation incontrôlée est responsable des phénomènes d'hypersécrétion des voies aériennes supérieures et de la contraction des muscles lisses (récepteurs muscariniques) et striés (récepteurs nicotiniques). Dans le SNC, on constate l'apparition rapide de signes électro-encéphalographiques anormaux évoluant rapidement en EME de longue durée (Carpentier et al. 2008, McDonough et Shih 1997).

On distingue généralement trois phases lors de l'initiation et de la généralisation des crises épileptiques induites par le soman.

- Une augmentation rapide des taux d'ACh extracellulaire s'opère dans le cerveau à la suite de l'inhibition de l'AChE (Fosbraey et al. 1990, Lallement et al. 1992a, Shih 1982). Il est

généralement admis que cette hypercholinergie joue un rôle majeur dans le déclenchement des crises épileptiques (Carpentier et al. 2008, McDonough et Shih 1997). Certaines régions semblent plus particulièrement impliquées dans l'initiation des crises épileptiques, parmi lesquelles le cortex piriforme, le septum médian (Denoyer et al. 1992, Lallement et al. 1992b, Myhrer 2007) et l'amygdale (Apland et al. 2009). Durant cette phase, l'EME peut être stoppé efficacement en utilisant tous les composés qui vont permettre de lutter contre les effets de l'hypercholinergie, en particulier les antagonistes muscariniques (Carpentier et al. 2000). Contrairement à la quantité totale d'ACh qui reste supérieure à la normale pendant plusieurs heures après l'intoxication (16 h dans l'hippocampe du rat intoxiqué par une dose de 0,9 DL₅₀ de soman (Shih 1982)), le taux d'ACh extracellulaire revient plus rapidement à une concentration normale (après 50 min dans l'hippocampe du rat intoxiqué par la même dose de soman (Lallement et al. 1992a)).

Pendant cette phase, de nombreux autres systèmes de neurotransmission sont perturbés :

- diminution de l'activité inhibitrice exercée par le GABA sur les récepteurs de type GABA_A durant la phase de recrutement des systèmes de neurotransmission non cholinergiques (Lallement et al. 1993) ;
- augmentation de la transmission dopaminergique dans le cortex, l'hippocampe, puis dans le striatum (Fosbraey et al. 1990) ;
- diminution de la concentration en noradrénaline (McDonough et Shih 1997).

Progressivement, l'extension des crises va aboutir à l'activation d'autres systèmes de neurotransmission. L'hyperactivation cholinergique conduit progressivement au recrutement du système glutamatergique, qui se traduit par une augmentation non régulée de la

concentration extracellulaire du glutamate dans de nombreuses régions cérébrales telles que l'hippocampe, l'amygdale, le cortex piriforme ou le septum (Lallement et al. 1991a, Lallement et al. 1991b, Lallement et al. 1991c, Lallement et al. 1992b, Wade et al. 1987). Ce phénomène explique la perte d'efficacité progressive des antimuscariniques purs pour stopper le développement de l'EME (McDonough et Shih 1997, Shih et al. 1999). Comme nous l'avons décrit précédemment pour d'autres cas d'EME, l'efficacité des benzodiazépines tend à diminuer, probablement en raison de l'internalisation des récepteurs GABA_A (Chen et Wasterlain 2006). Cette augmentation de la concentration du glutamate est responsable de l'auto-entretien des crises épileptiques et de l'initiation des dommages cellulaires qui les accompagnent (Carpentier et al. 2008, Shih et McDonough 1997) par les mécanismes excitotoxiques décrits précédemment (Olney et al. 1986). En effet, la phase cholinergique, qui démarre immédiatement après l'intoxication et dure une vingtaine de minutes, n'entraîne pas de dommages cellulaires puisque l'acétylcholine n'a pas d'effets neurotoxiques directs (Sloviter et Dempster 1985).

- Trente minutes après le déclenchement des crises, le système glutamatergique devient le principal facteur de maintien des crises, ce que confirme l'efficacité sélective des antagonistes NMDA utilisés dans la période 30-60 min, comme c'est le cas pour le MK-801 (Braitman et Sparenborg 1989, Sparenborg 1991, Sparenborg et al. 1993, Sparenborg et al. 1992), la TCP (Blanchet 1992, Carpentier et al. 2001, Carpentier et al. 1994, de Groot et al. 2001), le GK11 (Bhagat et al. 2005, Lallement et al. 1999, Lallement et al. 1997a) et la kétamine (Dorandeu et al. 2005, Dorandeu et al. 2007).

- Au-delà de 60 min, on constate une tendance à la réduction de l'intensité des crises et à une diminution progressive de la concentration extracellulaire en glutamate alors que les

dommages cellulaires se généralisent (Lallement et al. 1991a, Lallement et al. 1991b, Lallement et al. 1991c, Lallement et al. 1992b, Wade et al. 1987). À ce stade, les anti-NMDA perdent l'efficacité qu'ils possèdent pour stopper les crises lorsqu'ils sont utilisés plus précocement. Ce phénomène peut être lié à d'autres perturbations neurochimiques, qui restent mal connues au-delà de 60-90 min. En effet, seules quelques études portant sur les neurotransmetteurs font apparaître une augmentation du métabolisme sérotoninergique 2 à 4 h après le début des crises (el-Etri et al. 1992, Fosbraey et al. 1990).

Après intoxication par le soman chez le rongeur, de nombreuses régions cérébrales, appartenant principalement au système limbique, présentent des lésions (Tableau n° 2) induites par des crises épileptiques d'une durée minimale de 20 à 40 min (Carpentier et al. 2000, Carpentier et al. 1994, Lallement et al. 1994, McDonough et al. 1995). Chez le rat, les zones les plus fortement lésées sont le thalamus, l'amygdale, le septum latéral, le cortex piriforme/entorhinal et l'hippocampe (Carpentier et al. 1990, Lemerancier et al. 1983). L'intensité des lésions varie en fonction de la dose de toxique administrée. On constate aussi une différence de sensibilité en fonction des espèces animales. Par ailleurs, selon les espèces animales considérées, les régions du cerveau ne présentent pas la même vulnérabilité aux lésions neuronales induites par l'intoxication par le soman. Ce phénomène peut être mis en évidence par l'étude de la disparité des zones préférentiellement lésées chez les animaux intoxiqués ayant présenté des crises convulsives de courte durée. Alors que le thalamus semble présenter une vulnérabilité maximale chez la souris (Baille et al. 2005), les régions les plus sensibles semblent être l'amygdale chez le cobaye (Carpentier et al. 2000), le cortex piriforme chez le rat (Lemerancier et al. 1983, McDonough et al. 1995), l'amygdale et l'hippocampe chez le primate (Baze 1993, Britt et al. 2000, Hayward et al. 1990, Lallement et al. 2000).

Thalamus	+++
Hypothalamus	++
Clastrum	++
Amygdale	+++
Septum latéral	+++
N. accumbens	++
N. préoptique	++
C. mamillaire	++
C. géniculé	++
C. cingulaire	++
C. piriforme	+++
C. enthorinal	+++
Subst. noire	+++
Hippocampe	+++
Cervelet	+
Striatum	+
Capsule interne	-
Commissure antérieure	-
Fimbria	-
Corps calleux	-

Tableau n° 2 : Fréquence des zones cérébrales lésées chez le rat après intoxication au soman (85 µg/kg).
Illustration d'après Carpentier 1990.
(C : cortex, N : nucleus).

III. Conséquences cliniques de l'intoxication et prise en charge médicale

Cliniquement, l'intoxication aiguë par le soman est essentiellement caractérisée par un syndrome de détresse respiratoire (bronchospasme, hypersécrétion bronchique, paralysie des muscles respiratoires, blocage des centres respiratoires...) responsable des décès qui, selon la dose, peuvent intervenir dans les premières minutes suivant l'intoxication. En cas de survie, un syndrome convulsif intense peut s'installer et perdurer pendant plusieurs heures. Les crises épileptiques, initialement partielles, se généralisent en quelques minutes et s'accompagnent de lésions du SNC (Lemerrier et al. 1983) dont l'importance est corrélée positivement avec l'intensité et la durée des crises épileptiques (Carpentier et al. 2000).

Comme c'est le cas pour de nombreux types d'atteintes du SNC (traumatisme crânien, ischémie...), les lésions cellulaires cérébrales liées à l'intoxication par les NOP sont

accompagnées d'une réaction inflammatoire dans le tissu cérébral qui reste mal connue jusqu'à présent. Quelques travaux s'intéressant à la réaction inflammatoire centrale ont été réalisés après intoxication par le soman (Angoa-Perez et al. 2010, Dillman et al. 2009, Gordon et Rowsey 1998, Johnson et Kan 2010, Svensson et al. 2005, Svensson et al. 2001, Williams et al. 2003). Cependant, ces études ne permettent pas de préciser les caractéristiques générales de la réponse inflammatoire centrale liée à l'intoxication par le soman en raison de la disparité des modèles, des temps d'étude, de la méthodologie, et des paramètres de la réponse inflammatoire étudiés. Par ailleurs, les conséquences de l'intoxication par le soman sur l'inflammation systémique n'ont été que très peu étudiées (Sevaljevic et al. 1992, Sevaljevic et al. 1987). Les perturbations inflammatoires (périphériques ou centrales) susceptibles d'être occasionnées par des NOP autres que le soman, après intoxication aiguë, n'ont pas fait l'objet d'études spécifiques à l'exception du sarin (Chapman et Meldrum 2006, Grauer et al. 2008).

À l'heure actuelle, les médications anti-NOP préconisées par les services de santé des Armées français et étrangers reposent, en cas de risque élevé d'attaque chimique, sur l'administration préventive de pyridostigmine, un inhibiteur réversible des cholinestérases. Ce prétraitement permet de protéger 20 à 30 % de l'AChE périphérique de l'inhibition irréversible par les NOP. En cas d'attaque chimique avérée, les combattants français doivent, dès les premiers signes de l'intoxication, utiliser une seringue auto-injectable à deux compartiments (Figure n° 8) qui comporte les composés suivants : le sulfate d'atropine (SA), antimuscarinique qui limite globalement les effets de l'hypercholinergie, une oxime réactivatrice de l'AChE (Méthylsulfate de pralidoxime, Contrathion[®]) et une benzodiazépine anticonvulsivante (pro-diazépam, Avizafone[®]). Cette thérapeutique est d'une grande efficacité si elle est utilisée dès les premières minutes qui suivent l'intoxication. En effet, l'administration de deux auto-injecteurs permet la survie du singe *Cynomolgus* intoxiqué avec une très forte dose de soman, 8 DL₅₀ (Lallement et al. 1999).



Figure n° 8 : Seringue auto-injectable bi-compartment Ineurope®.

Cependant, de multiples scénarios d'attaque chimique peuvent être imaginés : dans ces scénarios, le personnel combattant (attaque chimique non anticipée) ou les civils (attentat) ne seront pas prétraités, et/ou recevront leur traitement ou à doses trop faibles, et/ou seront exposés à une forte dose de toxique. Dans ce cas, les intoxiqués pourraient décéder rapidement ou être victimes de crises épileptiques de très longue durée, accompagnées de lésions cérébrales elles-mêmes responsables de séquelles neuropsychiques majeures. Ce scénario catastrophe est particulièrement plausible dans le cas d'une intoxication par le soman. Comme déjà précisé, le mécanisme de vieillissement enzymatique occasionné par ce NOP étant très rapide, la fenêtre thérapeutique pendant laquelle on peut agir efficacement est extrêmement courte, de l'ordre de 10 à 20 min (McDonough et Shih 1997). Par ailleurs, les stratégies thérapeutiques actuelles pourraient s'avérer insuffisantes en cas d'intoxication par une forte dose de toxique. Cela a été montré chez le primate intoxiqué par 8 DL₅₀ de soman chez lequel l'administration de deux auto-injecteurs permet la survie sans stopper totalement les crises et les lésions cérébrales associées (Lallement et al. 1999).

Les limites thérapeutiques actuelles imposent le développement de recherches afin d'améliorer les traitements en explorant d'autres voies thérapeutiques et en testant des médications adjuvantes. En effet, les délais incompressibles de prise en charge par les

services de secours d'une victime intoxiquée impliquent de disposer de traitements efficaces même s'ils sont initiés 30 à 40 min après le début des crises épileptiques. Par ailleurs, l'utilisation des NOP contre des forces armées ou contre des populations civiles pourrait conduire à un afflux massif de personnes intoxiquées dans les postes de secours ou dans les services hospitaliers, conduisant à un débordement des capacités des services d'urgence et de réanimation. Enfin, les thérapeutiques actuelles visent principalement à stopper l'EME sans prise en considération de l'ensemble des conséquences liées au développement d'une réaction inflammatoire centrale et périphérique après l'intoxication. La poursuite des recherches visant à étendre les propriétés thérapeutiques du traitement d'urgence utilisable en milieu pré-hospitalier est donc nécessaire.

Chapitre III – Système nerveux central et inflammation

Le processus inflammatoire susceptible de se développer dans les tissus cérébraux à la suite de lésions provoquées par un traumatisme crânien, une hypoxie cérébrale ou d'autres mécanismes excitotoxiques, est une réaction de défense de l'organisme visant à amorcer la régénérescence cellulaire. Dans le SNC, les mécanismes inflammatoires, s'ils sont mal contrôlés, peuvent causer des dommages secondaires et aggraver les lésions initiales.

Le cerveau présente des caractéristiques ayant souvent conduit à considérer cet organe comme « immunospécialisé » en raison de la présence d'une structure complexe, la BHE, qui isole le SNC vis-à-vis de la circulation périphérique et n'autorise que des échanges limités entre le sang et le parenchyme cérébral. Les processus inflammatoires qui se développent dans le SNC passent par des mécanismes spécifiques encore incomplètement décrits, impliquant notamment des cellules résidentes du SNC.

Le cerveau est principalement composé de deux grands types cellulaires : les cellules nerveuses et les cellules gliales (microglie, astrocytes, oligodendrocytes). En quantité 10 fois plus importante que les cellules nerveuses, les cellules gliales occupent l'espace laissé vacant par les neurones. Électriquement silencieuses, les cellules gliales ont d'abord été décrites comme de simples éléments de cohésion du tissu nerveux, alors qu'elles jouent des rôles essentiels, parmi lesquels un rôle de modulation de la réponse inflammatoire.

À la suite d'une lésion cérébrale aiguë, la réponse inflammatoire fait intervenir les cellules gliales ainsi que d'autres types cellulaires présents dans le parenchyme cérébral, parmi lesquels on trouve les cellules endothéliales, les cellules périvasculaires et les péricytes. En outre, la réponse inflammatoire qui se développe au niveau central semble pouvoir être modulée par l'intervention de médiateurs moléculaires circulants ou d'acteurs périphériques cellulaires tels que les leucocytes ou les cellules dendritiques.

I. Les médiateurs cellulaires de la réponse inflammatoire cérébrale

I.1 La microglie

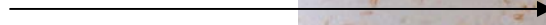
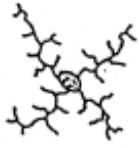
Les cellules microgliales constituent 5 à 20 % des cellules gliales de la substance cérébrale. En l'absence de facteurs stimulant leur activation, les cellules microgliales conservent une forme quiescente, ramifiée. Elles sont très sensibles aux variations biochimiques du parenchyme cérébral et sont rapidement activées à la suite d'atteintes des cellules neuronales (Hailer 2008). D'un point de vue phénotypique, les cellules microgliales quiescentes se caractérisent par une expression faible du CD11b, du marqueur leucocytaire CD45, et une expression très limitée des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II. Les corps cellulaires des cellules microgliales quiescentes ne semblent pas mobiles. Au contraire, leurs ramifications qui possèdent d'importantes capacités d'extension et de rétraction. Elles maintiennent ainsi un état de « veille active » par l'établissement de contacts avec les corps cellulaires des neurones, les synapses, les astrocytes et les vaisseaux sanguins environnants, leur permettant de sonder l'environnement et d'influer sur l'activité neuronale (Nimmerjahn et al. 2005, Tremblay et al. 2010).

Une des caractéristiques principales des cellules microgliales activées est leur capacité à proliférer et à se déplacer pour s'accumuler sur le site de la lésion. Leur programme d'activation est séquentiel (Ponomarev et al. 2006) et comprend des modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles. Les modifications morphologiques des cellules microgliales, de la forme quiescente (Figure n° 9-A) à la forme activée, s'opèrent progressivement par une augmentation de l'épaisseur des prolongements cytoplasmiques (forme hyper-ramifiée – Figure n° 9-B), puis par une hypertrophie de leur corps cellulaire accompagnée d'un raccourcissement des prolongements cytoplasmiques (Figure n° 9-C). Elles expriment également plus fortement les molécules CD11b et CD45 et induisent

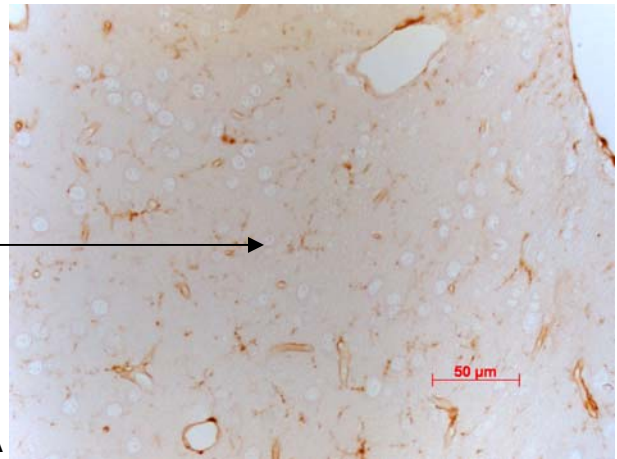
l'expression de toutes les molécules du CMH I et II, nécessaires à une présentation antigénique efficace. Elles deviennent capables de sécréter tout un éventail de facteurs susceptibles de réguler la réponse immunitaire et peuvent également assurer une fonction phagocytaire.

Ces propriétés permettent aux cellules microgliales activées d'induire puis de maintenir une réaction inflammatoire dans le SNC à la suite d'un facteur déclenchant. Cette capacité d'activation permet la défense du SNC contre différents types d'agression, qu'il s'agisse d'agents infectieux, d'agents biochimiques toxiques ou de phénomènes de neurodégénérescence. Lors de leur activation, les cellules microgliales produisent un grand nombre de médiateurs de l'inflammation parmi lesquels on trouve des cytokines pro-inflammatoires ainsi que leurs récepteurs membranaires (voir p. 80), des eicosanoïdes, dérivés de l'acide arachidonique (voir p. 97) ou des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERN). La production de ces médiateurs est généralement néfaste pour l'intégrité tissulaire cérébrale. En effet, les données expérimentales existantes semblent plutôt indiquer un effet neuroprotecteur du contrôle de l'activation microgliale par un certain nombre de traitements pharmacologiques immunosuppresseurs (Tokime et al. 1996, Zawadzka et Kaminska 2005) ou par l'administration de minocycline (Filipovic et Zecevic 2008, Riazi et al. 2008, Wang et al. 2007). Inversement, la microglie activée est une source de facteurs neurotrophiques d'action protectrice tels que le *Nerve Growth Factor* (NGF), le *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) ou le *Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) (Madinier et al. 2009, Neumann et al. 2006).

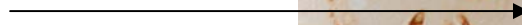
**Microglie
quiescente**



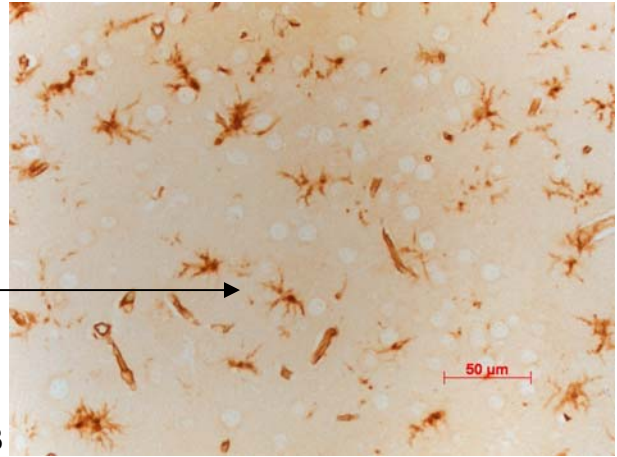
A



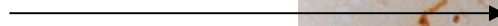
**Microglie
hyper-ramifiée**



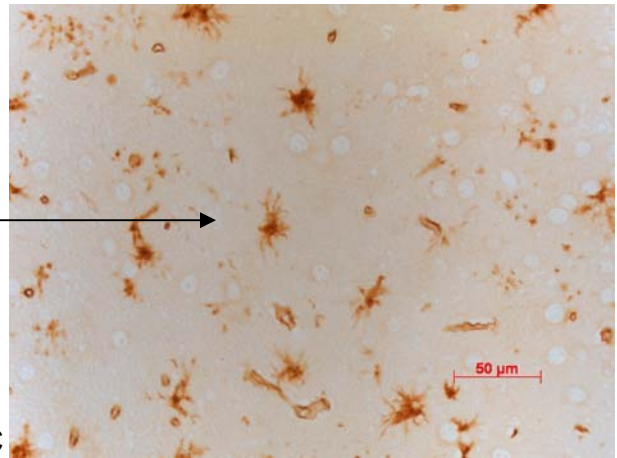
B



**Microglie
activée**



C



**Microglie
amiboïde**



D

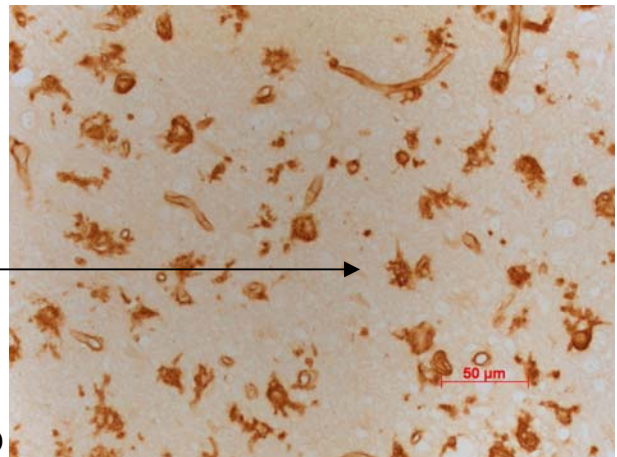


Figure n° 9 : Différentes morphologies des cellules microgliales en fonction de leur niveau d'activation.
Exemple du cortex (A) ou de l'amygdale (B, C, et D) de souris témoins (A) et de souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.), 24 h (A), 48 h (B) et 72 h (C) après intoxication. Barre d'échelle = 50 µm.

Dans leur dernier stade d'activation, les cellules microgliales prennent une forme amiboïde (Figure n° 9-D). Hypertrophiées avec de rares prolongements cytoplasmiques, elles deviennent indiscernables des macrophages périphériques, tant du point de vue morphologique que phénotypique. A ce stade d'activation, elles montrent une activité phagocytaire intense.

Le marquage des cellules microgliales est possible par l'utilisation de l'isolectine IB4 dérivée de *Griffonia simplicifolia* (GSA-IB4), qui marque les cellules microgliales en se liant spécifiquement aux chaînes d'oligosaccharides présentes à la surface de ces cellules. Ce marquage ne permet cependant pas de différencier les cellules microgliales activées (amiboïde) des cellules macrophagiques en provenance de la périphérie.

La différenciation du phénotype des différentes cellules immunocompétentes cérébrales est un problème complexe en raison de l'origine commune de ces différentes populations cellulaires. Ainsi, les monocytes circulants, les cellules périvasculaires et les cellules microgliales résidentes présentent le CD45, un marqueur commun à tous les leucocytes. Par ailleurs, au cours de leur activation, les cellules microgliales quiescentes, ainsi que les autres cellules immunocompétentes subissent une modification de leur phénotype (Avanzini et Franceschetti 2003). Il apparaît que l'utilisation du marqueur CD11b, commun à toutes les populations cellulaires d'origine myéloïde (à l'exception des lymphocytes), permet de différencier les cellules immunocompétentes des autres catégories de cellules du SNC. Parallèlement, le marqueur CD14 est fortement exprimé à la surface des monocytes, des macrophages, des cellules périvasculaires, mais faiblement à la surface des cellules microgliales quiescentes (Aloisi 2001, Guillemin et Brew 2004). Aucune étude ne montre une expression du CD14 à la surface des cellules microgliales au cours de leur activation : ce marqueur paraît être un candidat intéressant à la discrimination des cellules microgliales

résidentes des cellules périvasculaires et des macrophages infiltrant dans le SNC (Navarro 2007). Au cours de nos expérimentations, nous n'avons pas réussi à élaborer une technique fiable de révélation du CD11b sur des coupes incluses en paraffine chez la souris, ce qui ne nous a pas permis d'améliorer la différenciation des cellules macrophagiques résidentes ou infiltrantes dans le parenchyme cérébral.

Après l'induction d'un EME par administration systémique d'acide kaïnique chez le rat, on observe une activation microgliale dans les zones CA1 et CA3, le GD, le septum latéral, le thalamus, l'amygdale ainsi que dans le cortex frontal, pariétal, temporal, entorhinal et piriforme (Ravizza et al. 2005, Sharma et al. 2008, Vezzani et al. 1999b). Cette activation, détectée dès la 8^e heure dans les structures limbiques (Taniwaki et al. 1996), persiste pendant plusieurs semaines (Sharma et al. 2008). De même, après l'induction d'un EME par la pilocarpine chez le rat, une activation microgliale durable se développe au-delà de 24 h, en particulier dans les régions CA1, CA3 de l'hippocampe et dans le hile (Kang et al. 2006, Shapiro et al. 2008).

L'ensemble de ces études a fait appel à différents marquages immunohistochimiques de ED1, CD68, Iba1 ou CD11b, exprimés indifféremment par la microglie ou les monocytes/macrophages.

I.2 Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales caractérisées par des prolongements cytoplasmiques leur donnant une forme étoilée. Après les oligodendrocytes, il s'agit des cellules les plus nombreuses du SNC dont il existe différents types assurant des fonctions multiples. Elles constituent une population cellulaire hétérogène dont une des caractéristiques communes est l'expression constitutive de la protéine acide des gliofilaments (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, GFAP) (Anderl et al. 2009).

Les astrocytes jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie cérébrale et la fonction neuronale, ainsi qu'un rôle structural par la formation d'un réseau tridimensionnel. Ils régulent le métabolisme et l'alimentation en glucose des neurones (Figure n° 10), ainsi que les taux extracellulaires de K^+ . Ils agissent également sur la recapture des différents neurotransmetteurs, influant ainsi sur l'intensité d'un signal et sa durée (Sofroniew et Vinters 2010). Les astrocytes agissent en particulier sur la recapture du glutamate, mais sont aussi capables de sécréter du glutamate par un mécanisme dépendant du calcium (Wetherington et al. 2008) susceptible d'influencer fortement la transmission synaptique neuronale (Bergersen et Gundersen 2009, Jourdain et al. 2007). Ce processus pourrait participer au phénomène de synchronisation neuronale par l'intermédiaire du glutamate astrocytaire sur des récepteurs NMDA extra-synaptiques (Lee et al. 2007a). La mise en place de ce mécanisme particulier semble liée aux phénomènes excitotoxiques (Gouix et al. 2009, Leveille et al. 2008).

En recouvrant complètement la surface des capillaires, les pieds vasculaires des astrocytes participent à la BHE, régulant l'accès des cellules immunocompétentes sanguines au parenchyme cérébral (Bechmann et al. 2007).

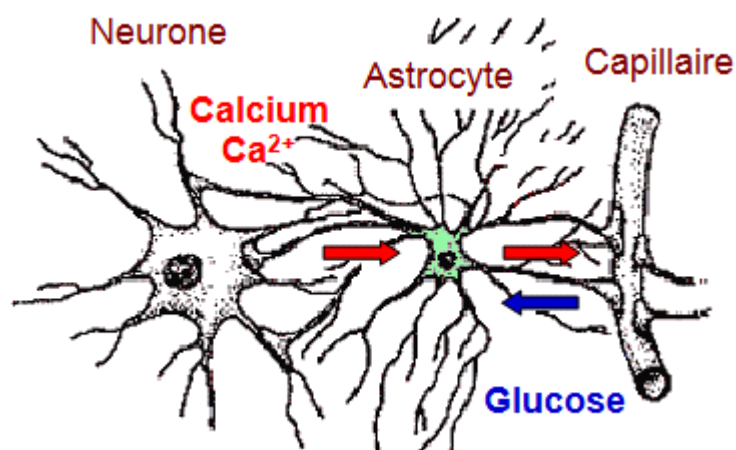


Figure n° 10 : Relations neurones-astrocytes-capillaires
Illustration consultable à l'adresse : www.medicopedia.net/term/16052.1.xhtml.

Toute atteinte du SNC induit une hyperplasie et une hypertrophie rapide des astrocytes, constituant le mécanisme d'astrogliose (Figure n° 11). Les astrocytes expriment alors de manière accrue la protéine GFAP (Baba et al. 1997, Gomes et al. 1999) et créent autour de la lésion une barrière physique et chimique appelée « cicatrice gliale ».

L'activation astrocytaire peut avoir des conséquences antagonistes (Farina et al. 2007). Par exemple, la production de facteurs neurotrophiques ou la promotion de la réparation de la BHE peuvent favoriser la survie neuronale (Faulkner et al. 2004, Myer et al. 2006, Sofroniew 2005, Sofroniew et Vinters 2010). A l'inverse, la mise en place de la cicatrice gliale est préjudiciable aux processus de réparation et en particulier à la repousse axonale (Itoh et al. 2007, Rolls et al. 2009, Wanner et al. 2008).

L'augmentation de la concentration de K^+ extracellulaire au cours des crises d'épilepsie semble pouvoir être mise en relation avec une altération du fonctionnement des canaux Kir, responsables de la recapture du K^+ par les astrocytes en condition physiologique (de Lanerolle et al. 2010).

En agissant sur la transmission glutamatergique, les astrocytes jouent certainement un rôle déterminant dans le processus de synchronisation neuronale (Fellin et al. 2004). Ce phénomène est susceptible d'être particulièrement important dans l'hippocampe sclérotique, contribuant alors au phénomène d'épileptogenèse. Dans cette structure, l'augmentation du glutamate extracellulaire pourrait être due à une diminution de la recapture du glutamate par les astrocytes (Cavus et al. 2005). Les mécanismes en jeu, parmi lesquels la diminution du nombre des transporteurs astrocytaires EAAT1 et EAAT2 du glutamate, ne sont pas précisément connus (Seifert et al. 2010). La diminution de la glutamine synthase dans l'hippocampe sclérotique (Eid et al. 2008) pourrait expliquer la baisse de la recapture du glutamate extracellulaire et pourrait être à l'origine d'une diminution de la production de glutamine nécessaire à la synthèse du GABA (Liang et al. 2006). L'augmentation du nombre

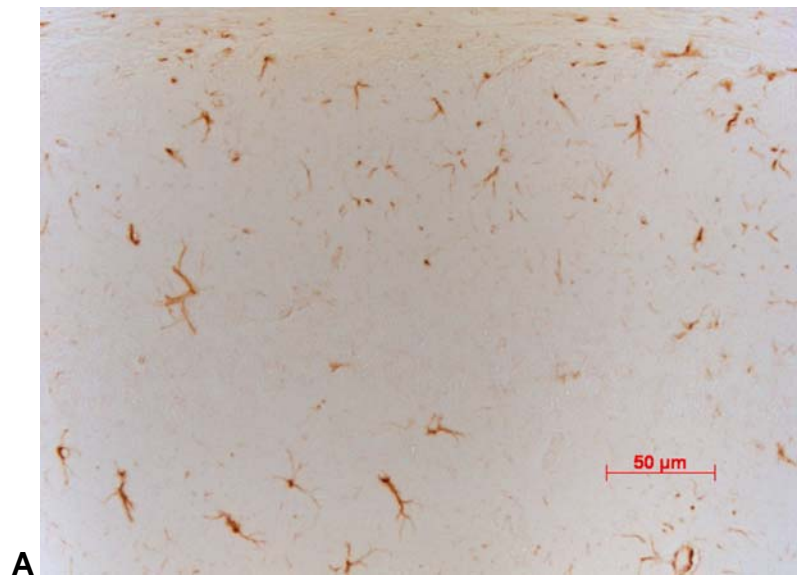
de transporteurs GAT3 du GABA, à la surface des astrocytes activés pourrait être responsable d'une recapture excessive de ce neurotransmetteur inhibiteur (de Lanerolle et al. 2010, Lee et al. 2006).

Une étude *in vitro* récente semble montrer l'implication des astrocytes dans la synchronisation de réseaux de neurones interconnectés (Gomez-Gonzalo et al. 2010). Les astrocytes, et en particulier les astrocytes activés, créent un important syncytium par des jonctions non synaptiques, et pourraient ainsi contribuer à la synchronisation de neurones distants (Rouach et al. 2008). L'onde calcique astrocytaire initiée par la décharge synchrone de quelques neurones isolés, accompagnée de la libération extra-synaptique de glutamate, pourrait ainsi conduire à la synchronisation d'une importante population de neurones non nécessairement connectés entre eux par des synapses (Collignon 2008, Navarro 2006).

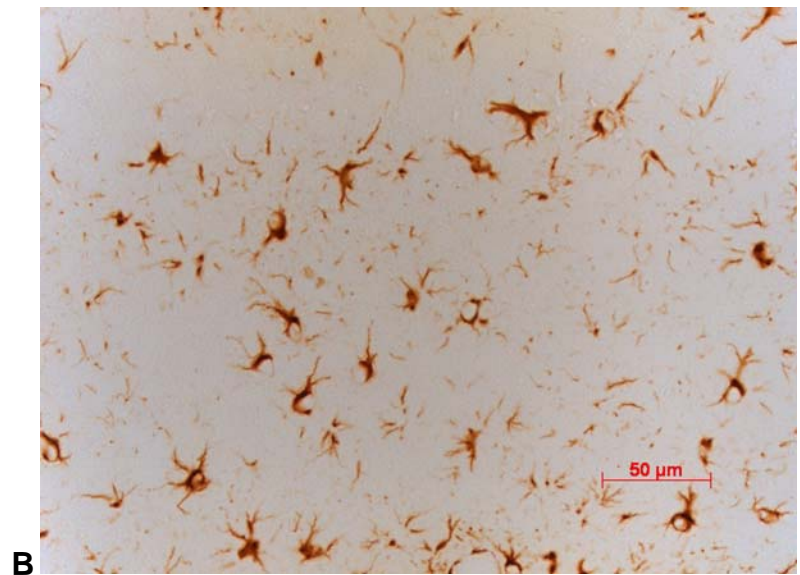
Les astrocytes jouent un rôle central dans la régulation de la réponse neuro-inflammatoire et produisent, après activation, un grand nombre de médiateurs inflammatoires présents en faible concentration dans les astrocytes quiescents (Benveniste 1997, Brambilla et al. 2005, Dong et Benveniste 2001, Farina et al. 2007, Jabs et al. 2008, Park et al. 2006). La production de médiateurs inflammatoires peut induire l'activation des cellules gliales avoisinantes, ce qui aboutit à une augmentation de la réponse inflammatoire locale.

Après induction d'un EME par la pilocarpine (Borges et al. 2006, Kang et al. 2006) ou l'acide kaïnique (Sharma et al. 2008), l'activation astrocytaire se développe dans des zones superposables à celles des lésions neuronales et de l'activation microgliale, mais avec retardement. Dans le cas de l'EME induit par la pilocarpine, une mort astrocytaire a été mise en évidence dans le GD, suivie d'une régénération astrocytaire après une durée de quelques jours, variable selon les modèles animaux étudiés (Borges et al. 2006, Kang et al. 2006).

**Astrocytes non
activés**



**Activation
astrocytaire
intermédiaire**



**Activation
astrocytaire
élevée**

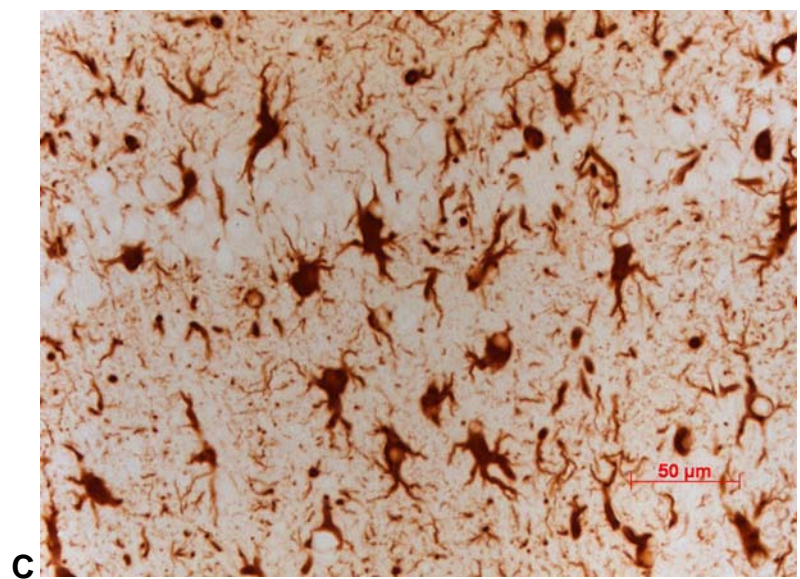


Figure n° 11 : Variations morphologiques des astrocytes en fonction de leur niveau d'activation.
Exemple de la zone CA1 de l'hippocampe chez une souris témoin (A) et chez une souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.), 48 h (B) et 7 j (C) après intoxication. Barre d'échelle = 50 μ m.

I.3 Autres acteurs cellulaires

Les cellules endothéliales possèdent un rôle capital lors des phénomènes inflammatoires, en réagissant par exemple à la stimulation par les cytokines circulantes (Golding 2002). Grâce à l'expression, à leur surface, de protéines d'adhésion, elles régulent la pénétration des cellules immunitaires circulantes (leucocytes) vers le parenchyme cérébral.

Par des mécanismes favorisant la migration trans-endothéliale que nous examinerons plus loin, les leucocytes sont capables de franchir l'endothélium vasculaire cérébral et de venir s'accumuler à proximité des zones cérébrales lésées.

L'infiltration leucocytaire apparaît dans les premières heures qui suivent une lésion cérébrale aiguë. Les granulocytes neutrophiles (GNN), décrits comme les premiers leucocytes présents en cas d'ischémie cérébrale, participent directement à l'aggravation des lésions initiales (Chopp et al. 1996). Les monocytes sont aussi susceptibles de franchir l'endothélium vasculaire, et de se transformer en macrophages dans le parenchyme cérébral. Les macrophages issus de la circulation périphérique ont alors une morphologie et une activité de phagocytose similaire à celles des cellules macrophagiques issues de l'activation des cellules microgliales.

II. Les médiateurs moléculaires impliqués dans la réponse inflammatoire cérébrale

Un certain nombre de médiateurs sont susceptibles d'être impliqués dans la réponse inflammatoire induite par le développement d'un EME. Nous avons restreint nos explorations à ces principaux médiateurs qui sont des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α , IL-6), des régulateurs de l'inflammation (SOCS3), des cytokines chimio-attractives (CXCL1, CCL5) ou des enzymes de la voie des eicosanoïdes (cPLA2 α , sPLA2, PGES, PGDS). Ce sont ces médiateurs que nous présenterons dans ce paragraphe.

II.1 Les différents acteurs de la réponse neuro-inflammatoire

II.1.1 Les cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines, synthétisées notamment par les neurones, les astrocytes, les cellules microgliales ou les cellules périphériques infiltrées dans le parenchyme, peuvent agir sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Leur action, par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, peut être autocrine (sur la cellule productrice ou une cellule proche du même type), paracrine (cellules proches) ou endocrine (cellules ou tissus distants). Ces cytokines et leurs récepteurs sont exprimés dans le SNC mais peuvent aussi provenir de la circulation sanguine en cas de syndrome inflammatoire périphérique. Dans ce cas, les cytokines circulantes sont susceptibles d'agir sur les cellules macrophagiques des organes circumventriculaires et du plexus choroïde, ou sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins cérébraux, favorisant la production locale de cytokines et de prostaglandines (PG) (Dantzer 2009). Nous nous sommes intéressés à l'IL-1 β , au TNF α et à l'IL-6, connus pour leur rôle majeur dans l'activation et/ou la prolifération des cellules microgliales et des astrocytes (Deng et al. 2006, Farber et Kettenmann 2005). Nous avons également étudié SOCS3 qui module les voies de signalisation pro-inflammatoires stimulées par l'IL-6.

II.1.1.1 L'interleukine-1

Tous les représentants des molécules de la famille IL-1 sont présents dans le SNC à très faible concentration dans les conditions physiologiques (Vitkovic et al. 2000a).

L'interleukine-1 (IL-1) ne constitue pas une protéine unique mais une famille de protéines. La famille de l'IL-1 est composée de deux isoformes agonistes : IL-1 α et IL-1 β et d'une forme antagoniste IL-1ra (pour *Receptor Antagonist*).

Il existe deux types de récepteurs membranaires des IL-1 (Figure n° 12) : IL-1 récepteur de type 1 (IL-1 RI) et IL-1 récepteur de type 2 (IL-1RII) (Oprica et al. 2003), ainsi que des formes solubles de ces mêmes récepteurs (Sims 2002). La fixation sur le récepteur IL-1RII ne produit pas d'effet, et limite l'action des agonistes qui ne se fixent alors pas sur le récepteur IL-1RI (Docagne et al. 2005). La fixation de l'IL-1 α ou de l'IL-1 β sur le récepteur IL-1RI nécessite la présence d'une protéine accessoire RAcP (*Receptor Accessory Protein*) permettant d'augmenter l'affinité de la liaison et d'initier la transduction du signal.

La production d'IL-1ra est induite par l'IL-1 β , à l'origine d'une boucle de rétrocontrôle via le récepteur IL-1RI. Pour cette raison, on constate un découplage temporel de la synthèse de ces deux médiateurs ainsi qu'une augmentation de la synthèse de l'IL-1ra postérieure à celle de l'IL-1 β , à des taux de 10 à 20 fois supérieurs (Bartfai et al. 2007). L'IL-1ra régule alors l'action de l'IL-1 α et de l'IL-1 β en se fixant avec la même affinité sur le récepteur IL-1RI sans induire la transduction du signal et en empêchant l'accession de l'IL-1 α et de l'IL-1 β au récepteur IL-RI (Dinarello 1991).

IL-1 α et IL-1 β sont synthétisées sous la forme de précurseurs (pro-IL-1 α et pro-IL-1 β). La pro-IL-1 α est active même en tant que précurseur (Mosley et al. 1987). Elle nécessite un phénomène de clivage par une calpaïne, protéase à cystéine membranaire, pour former l'IL-1 α (Kobayashi et al. 1990). De même, ICE/caspase-1 (IL-1 *Converting Enzyme*) est responsable du clivage de pro-IL-1 β pour donner la forme active de l'IL-1 β car la pro-IL-1 β n'a pas d'activité. L'expression de caspase-1 est constitutive dans le SNC (Eriksson et al. 1999).

L'activation de l'IL-1RI induit une voie intracellulaire très complexe qui fait intervenir différents mécanismes dont la voie des céramides, l'activation de NF- κ B et la voie des P38 et P42/44 MAP kinases (MAPK) (Li et al. 2005, Martin et Falk 1997). Il s'agit d'un phénomène complexe et variable selon la localisation tissulaire puisque dans l'hippocampe, l'IL-1 β active les p38 MAPK dans les neurones, alors que c'est préférentiellement la voie du

NF-kB qui est activée dans les astrocytes (Srinivasan et al. 2004). L'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 al. 1999).

L'IL-1 β est produite principalement par les cellules microgliales et plus modestement par les astrocytes. Les neurones semblent impliqués, mais de manière plus tardive, et en plus faible proportion (Allan et al. 2005). De même, les cellules microgliales sont la source principale de l'IL-1ra (Eriksson et al. 1998, Pinteaux et al. 2006).

Dans le SNC, l'IL-1 β est susceptible d'amplifier de manière significative la réponse neuro-inflammatoire par une stimulation rapide de l'activation astrocytaire et microgliale, ainsi qu'en stimulant le recrutement de leucocytes circulants (Herx et Yong 2001, Shaftel et al. 2008). Sur le plan moléculaire, l'IL-1 β favorise la production de médiateurs de l'inflammation tels que d'autres cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et prostaglandines (PGs) (Basu et al. 2004).

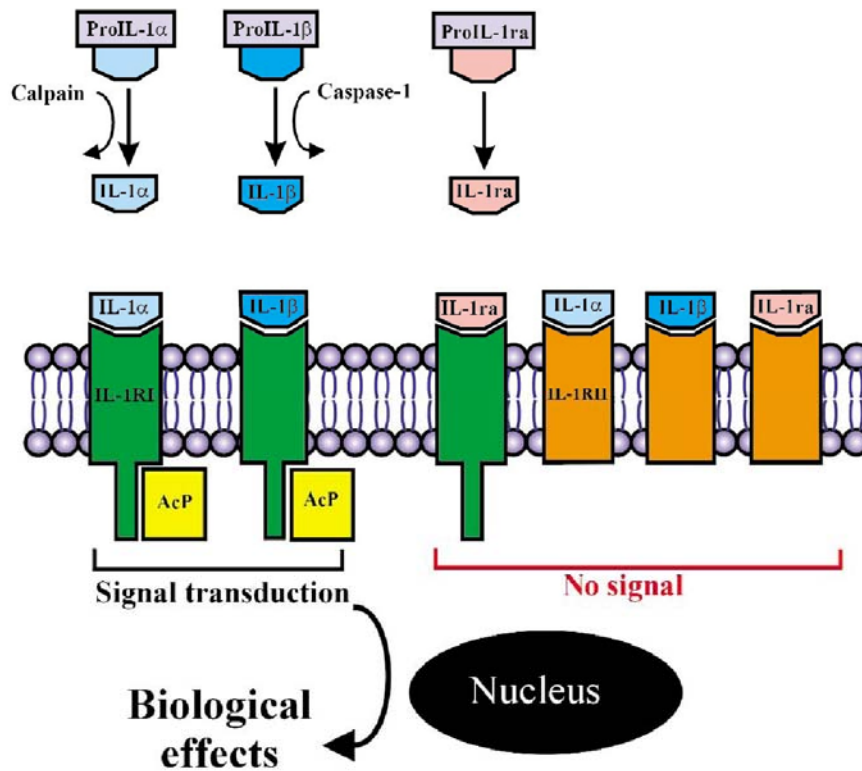


Figure n° 12 : Mécanisme de fixation de l'IL-1 sur ses récepteurs.
Illustration d'après Oprica (2003).

II.1.1.1.1 IL-1 β et excitabilité neuronale

Le rôle pro-épileptogène de l'IL-1 β a été mis en évidence dans différents modèles animaux d'épilepsie. L'administration intracérébrale d'IL-1 β favorise la survenue et augmente la durée de l'EME induit par l'administration d'acide kaïnique (Vezzani et al. 1999a). Les mécanismes en jeu sont multiples puisque l'IL-1 β augmente la libération neuronale de glutamate (Kamikawa et al. 1998) et inhibe sa recapture par les astrocytes (Ye et Sontheimer 1996).

L'injection intracérébrale d'un dérivé du glutamate (NMDA) stimule la production de l'IL-1 β (Hagan 1996). En retour, IL-1 β semble pouvoir interagir sur les récepteurs NMDA en les sensibilisant à l'action du glutamate (Dantzer 2009, Lai et al. 2006, Pinteaux et al. 2006, Rijkers et al. 2009, Wang et al. 2000) ou en induisant une modification de leur nombre ou de

leur conformation. L'IL-1 β peut aussi limiter le courant Cl⁻ contrôlé par les récepteurs GABA, limitant ainsi la transmission inhibitrice (Wang et al. 2000).

L'augmentation de la concentration cérébrale d'IL-1 β favorisant l'excitabilité neuronale pourrait contribuer à l'entretien des crises d'épilepsie (Ravizza et Vezzani 2006, Vezzani et al. 1999a, Vezzani et al. 2002), et favoriser le développement de crises épileptiques spontanées (Ravizza et al. 2008).

À l'inverse, l'IL-1ra possède des effets anticonvulsivants puissants puisque l'injection intracérébrale d'IL-1ra limite à la fois le nombre et la durée des crises d'épilepsie chez des rats traités par le kaïnate (Panegyres et Hughes 1998, Vezzani et al. 2002).

Les modèles d'épilepsie étudiés étant associés à des mécanismes de lésions neuronales, l'action de l'IL-1 β sur l'excitabilité neuronale est susceptible de s'exercer par la modulation des mécanismes neurotoxiques (Rijkers et al. 2009).

L'augmentation du taux d'ARNm de l'IL-1 β est détectée rapidement après la survenue de crises épileptiques induites par l'administration systémique d'acide kaïnique (Minami et al. 1990). Dans ce même modèle d'EME, la production d'ARNm de l'IL-1 β a été mise en évidence dans le cortex, le thalamus, le striatum et l'hippocampe. Cette augmentation est rapide, bi-phasique et transitoire. En effet, dans l'hippocampe, l'augmentation est observée dès 2 h après le début de l'EME, elle est ensuite suivie d'une diminution du taux d'ARNm détecté, puis d'un pic à 12 h, et d'un retour au taux de base après 4 j (Eriksson et al. 2000, Lehtimaki et al. 2003).

L'ARNm de l'IL-1 β est par ailleurs augmenté dans l'hippocampe dès 2 h, puis atteint son maximum 6 h après un EME induit par stimulation électrique de l'hippocampe ventral chez le rat (De Simoni et al. 2000).

L'augmentation du taux d'ARNm est suivie de la synthèse de la protéine dans ces modèles d'EME. En effet, la production d'IL-1 β a été révélée par immunohistochimie dès 5 h

après administration d'acide kaïnique chez le rat, avec une expression maximale à 12 h dans le thalamus et l'amygdale et à 24 h dans les cellules pyramidales de la couche CA1 de l'hippocampe et le cortex piriforme (Eriksson et al. 1999).

La production de l'IL-1 β par les cellules neuronales semble pouvoir s'opérer de manière différée du déclenchement initial de l'EME puisque l'IL-1 β a été mis en évidence dans les neurones de l'hippocampe 60 jours après le déclenchement de l'EME par stimulation électrique de l'hippocampe ventral chez le rat (De Simoni et al. 2000).

Dans le cas de l'intoxication par les NOP, des variations rapides et transitoires des ARNm d'IL-1 β et de sa protéine ont aussi été mises en évidence après intoxication par le soman (Dillman et al. 2009, Johnson et Kan 2010, Svensson et al. 2005, Svensson et al. 2001, Williams et al. 2003) ou le sarin (Chapman et al. 2001).

II.1.1.1.2 IL-1 β et neurotoxicité

Les effets de l'IL-1 β dans le développement de la réponse neuro-inflammatoire laissent penser que cette cytokine joue un rôle dans le déroulement des processus neuropathiques. Une activité neurotoxique de l'IL-1 β a été mise en évidence dans les structures cérébrales en souffrance : l'expression de l'IL-1 β a été détectée dans des modèles d'ischémie, de traumatisme crânien ou lors d'exposition à des neurotoxiques (Eriksson et al. 1998, Wang et al. 1997, Zhang et al. 1998b). D'autre part, l'injection intracérébrale de l'IL-1 β aggrave les lésions cérébrales (Allan et al. 2005, Wang et Shuaib 2002). Une augmentation des récepteurs à l'IL-1 β peut aussi être mise en évidence après ischémie cérébrale chez le rat (Wang et al. 1997). Le blocage de l'action de l'IL-1 β par l'administration concomitante d'IL1-ra, antagoniste spécifique de l'IL-1 β , diminue de manière significative les lésions cérébrales causées par les phénomènes ischémiques, traumatiques ou excitotoxiques (Panegyres et Hughes 1998, Stroemer 1998, Yamasaki et al. 1995). Cette protection s'exerce

sans effet de l'IL-1ra sur la sévérité ou la durée des crises dans le cas d'un EME induit par l'acide kaïnique (Panegyres et Hughes 1998). La toxicité neuronale de l'IL-1 β semble liée à la surexpression simultanée de son récepteur IL-1RI par les cellules neuronales. L'action toxique de l'IL-1 β pourrait s'expliquer par l'activation d'une voie de signalisation responsable de la phosphorylation de la sous-unité NR2B du récepteur NMDA, facilitant le flux de calcium vers l'intérieur du neurone, potentialisant ainsi la toxicité du glutamate (Viviani et al. 2003). Par ailleurs, la phosphorylation de NR2B semble favoriser la stabilisation du récepteur NMDA dans le compartiment membranaire en empêchant son endocytose et en protégeant la dégradation de cette sous-unité par les calpaïnes (Vezzani et Baram 2007). Enfin, l'IL-1 β active l'iNO-synthase, permettant ainsi la production accrue de NO qui, à son tour, favorise la libération accrue de glutamate (Casamenti et al. 1999, Hewett et al. 1994).

II.1.1.2 Le Tumor Necrosis Factor α

Le *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) est une glycoprotéine de 185 acides aminés (17 kDa) obtenue par clivage d'un précurseur transmembranaire de 212 acides aminés (26 kDa) par l'intervention d'une métalloprotéase appelée TACE (*TNF α alpha Converting Enzyme*). Après clivage, le TNF α est libéré sous la forme d'un homotrimère qui exerce ses effets de manière autocrine et/ou paracrine. Le TNF α est produit en quantité significative par les cellules myéloïdes et, dans le cerveau, par la microglie et les astrocytes (Hopkins et Rothwell 1995). Les neurones peuvent aussi produire du TNF α , particulièrement en conditions pathologiques (Gong et al. 1998, Knobloch et al. 1999, Panegyres et Hughes 1998, Vezzani et al. 2002). Les multiples effets biologiques du TNF α s'exercent par l'intermédiaire de deux récepteurs de surface distincts : TNFR1 (p55) et TNFR2 (p75) (MacEwan 2002, Wajant et al. 2003). Seul TNFR1 contient un domaine intracellulaire dit « de mort » DD

(*Death Domain*), capable d'induire directement l'apoptose. La voie de transduction du signal par TNFR1 est cependant très complexe. En recrutant la caspase-8 par l'activation d'une cascade de protéase, elle peut conduire au même type de mort cellulaire. Par l'intermédiaire du *TNF Receptor-Associated Factor 2* (TRAF2), elle peut aboutir à une activation du NF- κ B (Figiel 2008) (Figure n° 13). Le récepteur TNFR2 est moins bien connu. Il ne possède pas de domaine intracellulaire DD, et n'induit donc pas directement l'apoptose, mais un ensemble de cascades intracellulaires complexes.

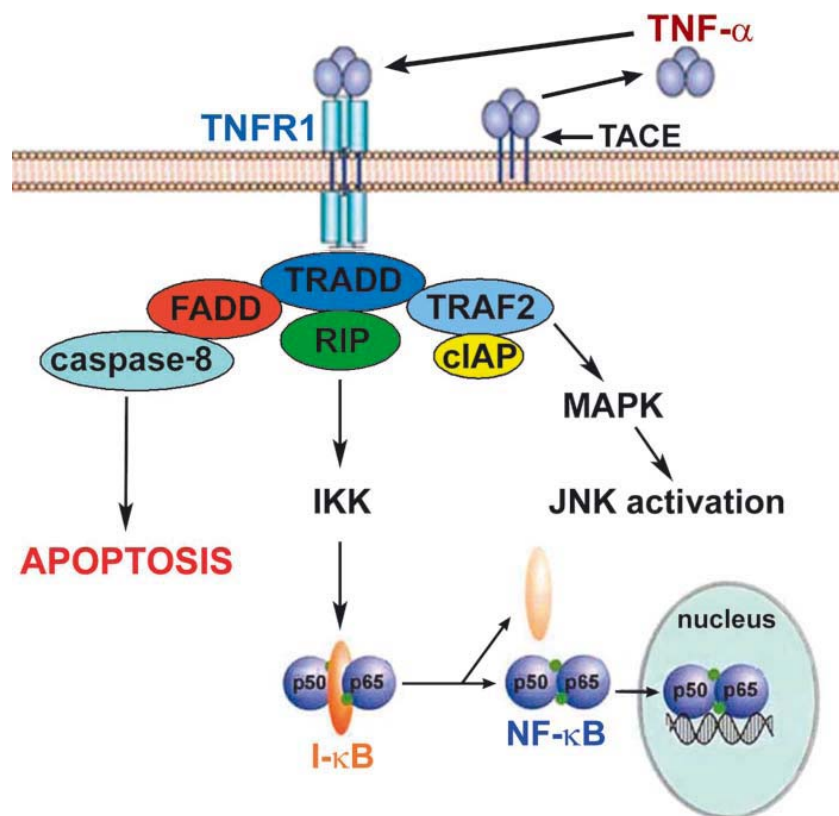


Figure n° 13 : Voie de transduction du signal de TNF α par le récepteur TNFR1.
Illustration d'après Figiel (2008).

Selon les conditions expérimentales, le TNF α semble avoir des effets variables sur l'excitabilité neuronale. En effet, la surexpression de TNF α dans les neurones de souris transgéniques favorise le développement d'une réponse inflammatoire centrale ainsi que la survenue de crises d'épilepsie et de décès précoces (Probert et al. 1995). Inversement, la surexpression de TNF α par les astrocytes de souris transgéniques conduit à une diminution de la durée de l'EME induit par l'administration d'acide kaïnique (Balosso et al. 2005).

Les effets antagonistes de TNF α pourraient dépendre des récepteurs exprimés par les neurones et les cellules gliales, qui sont de deux types (Dopp et al. 1997, Kinouchi et al. 1991). La distribution et l'expression des différents récepteurs dépendent des niveaux de régulation de la réponse inflammatoire ou apoptotique dans le SNC (Botchkina et al. 1997, Figiel et Dzwonek 2007, Lambertsen et al. 2007, Sairanen et al. 2001). Des souris transgéniques déficientes pour les deux récepteurs du TNF α développent un EME de plus longue durée après administration d'acide kaïnique (Balosso et al. 2005). On retrouve la même augmentation de l'excitabilité neuronale chez les souris dont seule l'expression du gène du TNFR2 est invalidée, alors que l'invalidation spécifique du gène de TNFR1 diminue l'excitabilité neuronale (Balosso et al. 2005). Le TNF α pourrait donc limiter l'excitabilité neuronale par l'intermédiaire de TNFR2, et augmenter l'excitabilité neuronale en agissant sur TNFR1. Bien que chaque type de récepteur induise un type de réponse biologique différent, de nombreuses interactions et des rétrocontrôles existent entre les différents signaux biologiques induits par la stimulation des différents types de récepteurs (Botchkina et al. 1997, Declercq et al. 1998, Figiel et Dzwonek 2007, Lambertsen et al. 2007, Quintana et al. 2005, Sairanen et al. 2001).

Le TNF α semble avoir aussi une action directe sur la plasticité synaptique et la composition membranaire en différents types de récepteurs. En effet, le TNF α favorise le recrutement de récepteurs AMPA dépourvus de sous-unité GluR2, une conformation qui

permet l'entrée accrue de Ca^{2+} dans le neurone, et facilite l'internalisation des récepteurs GABA_A (Beattie et al. 2002, Stellwagen et al. 2005).

Le $\text{TNF}\alpha$ peut être produit dans le cerveau par la microglie et les astrocytes activés (Hopkins et Rothwell 1995, Turrin et Rivest 2004) ainsi que par les neurones (Gong et al. 1998, Knobloch et al. 1999).

L'évolution des taux cérébraux d'ARNm du $\text{TNF}\alpha$ et de sa protéine sont assez similaires dans les différents modèles d'EME. Au cours d'un EME induit par l'administration systémique d'acide kaïnique, une augmentation significative du taux d'ARNm de $\text{TNF}\alpha$ a été mise en évidence entre 2 h et 4 h après le début de l'EME dans le cortex, le striatum le thalamus, l'hypothalamus et l'hippocampe (Lehtimaki et al. 2003, Minami et al. 1991), en particulier dans les neurones de CA1 et CA3 (Jankowsky et Patterson 2001). Dans un modèle d'EME par stimulation électrique de l'hippocampe ventral chez le rat, le taux d'ARNm du $\text{TNF}\alpha$ atteint son maximum après 6 h. Une augmentation de la concentration de la protéine correspondante a aussi pu être détectée avec un décalage temporel puisque le niveau maximum dans les cellules gliales est atteint entre 18 h et 48 h après le stimulus initial (De Simoni et al. 2000).

Dans le cas de l'exposition aux NOP, des variations rapides et transitoires des ARNm de $\text{TNF}\alpha$ ont été mises en évidence après intoxication par le soman (Williams et al. 2003) et le sarin (Chapman et al. 2006).

II.1.1.3 L'interleukine-6

La famille de l'interleukine-6 (IL-6) comprend un ligand (IL-6), un récepteur (IL-6R) et une glycoprotéine transmembranaire de 130 kDa (gp130). L'IL-6 présente une certaine homologie avec d'autres cytokines formant une superfamille. Il s'agit du *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), de l'interleukine-11 (IL-11), du *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) et de

l'oncostatine M (OSM). Cette famille est définie par le même mode de transduction du signal faisant intervenir la même glycoprotéine transmembranaire gp130 (Rose-John et al. 2006, Scheller et Rose-John 2006). L'IL-6 est produite sous la forme d'un précurseur, puis libérée après protéolyse. L'IL-6 exerce ses multiples effets biologiques par l'intermédiaire de l'IL-6R couplée à la gp130. La formation du complexe IL-6/IL-6R induit l'homodimérisation de gp130 et aboutit à la phosphorylation et à l'activation de tyrosines-kinases gp130-dépendantes (Janus Kinases (JAK)) (Rodig et al. 1998). Ces dernières entraînent alors de nombreuses cascades de réactions intracellulaires faisant intervenir les protéines STAT et certaines MAPK.

Le taux d'IL-6, faible dans les conditions physiologiques, augmente en cas de dommages dans le SNC. La synthèse de cette cytokine est favorisée par la présence de l'IL-1 β et du TNF α (Van Wagoner et Benveniste 1999) qui agissent en synergie avec de nombreux autres facteurs, et en particulier la noradrénaline (Norris et Benveniste 1993) et les PGE₁ et PGE₂ (Fiebich et al. 1997).

L'IL-6R est exprimé à la surface des neurones et des astrocytes, mais pas par les cellules microgliales, même en cas d'atteinte cérébrale (Klein et al. 1997). Certains types de neurones sont plus sensibles à l'administration d'acide kaïnique à des doses infraconvulsivantes chez des souris transgéniques surexprimant le gène de l'IL-6 dans leurs astrocytes (Samland et al. 2003). En revanche, l'IL-6 favorise la prolifération astrocytaire et la survie neuronale (Bensadoun et al. 2001, Thorns et al. 2002). Des souris mutantes, déficientes en IL-6, montrent par ailleurs une astrogliose diminuée à la suite d'une lésion focale (Penkowa et al. 1999) ainsi qu'une diminution de l'infiltration lymphocytaire (Raivich et al. 2003). Chez des souris déficientes en IL-6, l'activation microgliale et astrocytaire est diminuée après l'induction d'un EME par l'acide kaïnique, alors que la production d'ERO et le nombre de morts neuronales sont augmentés (Penkowa et al. 2001). Ceci suggère que l'IL-

6 peut être impliquée aussi bien dans des mécanismes d'activation gliale que de neuroprotection. L'IL-6, produite par les cellules microgliales et les astrocytes activés (Jankowsky et al. 2000, Rosell et al. 2003, Van Wagoner et Benveniste 1999, Van Wagoner et al. 1999), semble ainsi jouer un rôle central dans la régulation de la réponse inflammatoire dans le SNC par son rôle dans l'initiation de l'inflammation et sa capacité à réguler celle-ci dans sa phase aiguë (Viviani et al. 2004).

Les différents modèles d'EME étudiés présentent un profil d'évolution de l'ARNm de l'IL-6 relativement homogène. Dans l'hippocampe, on constate une augmentation rapide du taux d'ARNm de l'IL-6, entre 2 h (Minami et al. 1991) et 6 h (Lehtimaki et al. 2003) après un EME induit chez le rat par l'administration systémique d'acide kaïnique, et dès 4 h lorsque l'EME est induit par la pilocarpine (Rosell et al. 2003). De même, l'augmentation est détectée dès 2 h après stimulation électrique de l'hippocampe ventral (De Simoni et al. 2000). Les taux maximums sont atteints à la 6^e ou 12^e heure, respectivement dans le cas de la stimulation électrique de l'hippocampe (De Simoni et al. 2000) et de l'administration d'acide kaïnique (Lehtimaki et al. 2003). L'augmentation de l'ARNm d'IL-6 est transitoire puisque, dans l'exemple du modèle pilocarpine, la taux d'ARNm est fortement diminué à 48 h, avec un retour à la normale observé au 5^e jour (Rosell et al. 2003).

De la même façon, des variations rapides et transitoires des ARNm d'IL-6 ont été mises en évidence dans le cas de l'intoxication par le soman (Williams et al. 2003).

Les réponses au signal de l'IL-6 sont régulées par de nombreux mécanismes mettant en jeu les tyrosines phosphatases, l'internalisation des récepteurs, des récepteurs solubles de l'IL-6 (IL-6Rs) et une forme soluble de la gp130 (Rose et Bruce 1991, Scheller et Rose-John 2006) qui permet la neutralisation du ligand IL-6, ainsi que des inhibiteurs spécifiques tels que les *Suppressors Of Cytokine Signaling* (SOCS).

Les SOCS forment une famille de protéines intracellulaires qui contient au moins 7 types différents, SOCS1 à 7, capables de réguler négativement la voie des JAK/STAT, une voie de transduction du signal impliquée dans le mécanisme d'action de nombreuses cytokines (Alexander 2002, Campbell 2005, Yoshimura et al. 2007). L'expression des SOCS est généralement induite par l'action d'un grand nombre de cytokines sur leurs récepteurs spécifiques (Alexander 2002). La production des SOCS permet alors de lutter contre la cytokine inductrice, mais également contre la signalisation induite par d'autres cytokines qui utilisent la même voie de signalisation en bloquant l'activité des JAK. Nous nous sommes principalement intéressés à l'expression de SOCS3. Elle est rapidement transcrite par la stimulation des cytokines de la famille de l'IL-6. La recherche de l'ARNm de SOCS3 permet donc de mettre en évidence la transduction du signal cytokinique induit notamment par l'IL-6 (Crocker et al. 2003). Bien que différentes cytokines soient capables d'induire la production de SOCS3, plusieurs études semblent montrer le rôle central de l'IL-6 dans son induction (Yang et al. 2005). En raison de la place de l'IL-6 dans l'initiation et le contrôle des processus inflammatoires, SOCS3 occupe une place majeure dans la régulation de la progression de ces phénomènes par son activité de rétrocontrôle sur la production d'IL-6.

II.1.2 Les cytokines chimiotactiques ou chimiokines

Les chimiokines, ou cytokines chimiotactiques, forment une grande famille de plus de 50 polypeptides se distinguant des autres cytokines par leur petite taille (70 à 100 acides aminés), leur structure et la nature de leurs récepteurs. Il s'agit de polypeptides composés de séquences d'acides aminés similaires, avec une structure commune maintenue par deux ponts disulfures conservés (Foussat et al. 2000). Les chimiokines ont été classées en quatre sous-familles en fonction du nombre et de l'espacement des deux premiers résidus cystéine du côté N-terminal : C (lymphotactine), CC, CXC et CX3C. Une nouvelle nomenclature ajoutant pour

chaque sous-famille la lettre L (pour ligand) suivie d'un chiffre a été instituée (par exemple : CXCL1 à CXCL15, CCL1 à CCL27). Les chimiokines CXCL sont subdivisées en fonction de la présence ou non du motif ELR (acide glutamique-leucine-arginine) à proximité du motif CXC du côté N-terminal (Pease et Williams 2006). Les chimiokines se lient à des récepteurs spécifiques appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G.

Les principaux stimuli de la production de chimiokines sont les signaux précoces de la réponse inflammatoire. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF α induisent l'expression de diverses chimiokines (Ono et al. 2003).

Les chimiokines jouent un rôle clé dans la régulation du passage des leucocytes circulants à travers l'endothélium vasculaire (McCandless et Klein 2007). Elles contrôlent l'infiltration tissulaire par les leucocytes circulants en déclenchant l'activation de leurs intégrines (Ley et al. 2007). Après le passage de la BHE, le gradient interstitiel des facteurs chimiotactiques inflammatoires permet la migration cellulaire par mouvements amiboïdes jusqu'au site inflammatoire (Combadiere et al. 2007).

Les leucocytes expriment, de manière constitutive ou induite, des récepteurs de surface sensibles à l'action de facteurs chimiotactiques très variés (médiateurs lipidiques, anaphylatoxines, cytokines pro-inflammatoires, chimiokines). L'aptitude des leucocytes à répondre aux signaux chimiotactiques dépend du nombre et du type des récepteurs exprimés à la surface de la cellule. Certains facteurs exercent des effets sur une grande variété de cellules. De nombreuses cellules sont sensibles à l'action des médiateurs lipidiques, alors que les chimiokines ont une action plus ciblée. Cette sélectivité peut expliquer l'afflux préférentiel d'une population cellulaire au sein du foyer inflammatoire.

L'action des chimiokines dans le SNC ne se limite pas à cet effet sur l'infiltration du parenchyme par les leucocytes circulants. Un certain nombre d'entre elles semblent jouer un

rôle dans l'échange de signaux entre les neurones et les cellules gliales. Certaines chimiokines semblent en effet avoir une action sur la modulation des signaux d'activation des cellules gliales émis par les neurones, sur la modulation de la transmission synaptique excitatrice glutamatergique dans les neurones hippocampiques, ainsi que sur la régulation de la libération du glutamate stocké par les astrocytes (Trettel et al. 2008).

Lors de dommages cérébraux, l'expression des chimiokines a un impact délétère en favorisant l'infiltration par les leucocytes qui, par la suite, sont susceptibles d'aggraver les dommages préexistants. Dans un modèle d'ischémie transitoire chez le rat, l'inhibition du récepteur d'une chimiokine (CXCL8) diminue l'infiltration du parenchyme par les granulocytes neutrophiles (GNN) et réduit la taille de la zone cérébrale lésée (Garau et al. 2005). Dans le même modèle, chez la souris, la surexpression de MCP-1 conduit à une augmentation de l'infiltration par les GNN et macrophages ainsi qu'à une augmentation de la taille de la zone lésionnelle (Chen et al. 2003). Les chimiokines sont aussi capables de modifier la perméabilité de la BHE par un phénomène d'altération des protéines de jonction entre les cellules endothéliales (Stamatovic et al. 2005).

Chez l'homme, une augmentation du taux de l'ARNm de CCL2 (Xu et al. 2009), ainsi que de CCL3 et CCL4 (van Gassen et al. 2008) a été mise en évidence dans le tissu cérébral de patients atteints d'épilepsie du lobe temporal. Une augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur CXCR4, produit principalement par les cellules microgliales, a aussi été montrée dans l'hippocampe de patients atteints de la même affection (Lee et al. 2007b).

Chez l'animal, une augmentation de l'expression de CCL2 et CCR2 a été mise en évidence dans l'hippocampe après un EME induit chez la souris (pilocarpine) (Foresti et al. 2009) et chez le rat (acide kaïnique) (Manley et al. 2007), principalement dans les cellules gliales activées (Xu et al. 2009).

Nous avons choisi, dans nos expérimentations ultérieures, d'étudier les variations de l'expression de deux chimiokines (CXCL1 et CCL5) ayant une action attractive préférentielle sur certains types de leucocytes.

II.1.2.1 CXCL1

La chimiokine CXCL1 fait partie de la famille des ELR + CXC, lesquels ont une action sur le recrutement préférentiel des neutrophiles (Barsante et al. 2008, Pease et Williams 2006, Soares et al. 2008). Elle est aussi nommée *Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1* (CINC-1). La synthèse de CXCL1 est favorisée par l'action de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β ou le TNF α (Shaftel et al. 2007, Soares et al. 2008). Des expérimentations *in vitro* semblent indiquer que la production de CXCL1 se déroule majoritairement dans les astrocytes lors de dommages excitotoxiques neuronaux provoqués par le NMDA (Katayama et al. 2009). Dans un modèle de traumatisme crânien chez le rat, l'ARNm de CXCL1 mesurée par RT-qPCR dans le cortex a été détecté rapidement, dès la 2^e heure, avec un pic à la 6^e heure, suivie d'une diminution rapide, devenant non significative à partir de 24 h (Szmydynger-Chodobska et al. 2009). En cas d'ischémie cérébrale chez l'homme, le niveau de CXCL1 est significativement augmenté dans le liquide cérébro-spinal (LCS) après 24 h, et fortement corrélé au volume de la lésion cérébrale induite par l'ischémie (Losy et al. 2005).

II.1.2.2 CCL5

La chimiokine CCL5 exerce une action attractive préférentielle sur les monocytes/macrophages circulants (Ubogu et al. 2006, Viola et Luster 2008). L'augmentation de l'expression de l'ARNm et de la synthèse des protéines de CCL5 a été mise en évidence dans des cultures de cellules microgliales et astrocytaires après stimulation par l'IL-1 β et le

TNF α (Hu et al. 1999). Chez l'homme, l'augmentation du taux d'ARNm de CCL5 a été mise en évidence dans le parenchyme cérébral uniquement 6 j après traumatisme crânien (Stefini et al. 2008).

II.1.3 Les molécules d'adhésion

Les molécules d'adhésion interviennent dans chacune des séquences de migration des leucocytes. L'infiltration du parenchyme cérébral par les cellules circulantes implique plusieurs étapes successives (McCandless et Klein 2007) :

- l'interaction de faible affinité entre les polysaccharides à la surface de leucocytes et les sélectines à la surface des cellules endothéliales ralentit la vitesse du leucocyte dans le flux sanguin en permettant son « roulement ». Les leucocytes sont activés par ce premier contact et par la présence de facteurs chimiotactiques dans l'environnement vasculaire inflammatoire ;
- ce processus est suivi par l'arrêt complet du leucocyte et sa forte adhérence à l'endothélium par l'intermédiaire de contacts entre les intégrines des leucocytes et les molécules d'adhésion des cellules endothéliales (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine, P-sélectine) ;
- une perméabilité transitoire permet ensuite la diapédèse endothéliale. Le leucocyte entre en contact, de l'autre côté de la paroi vasculaire, avec les éléments de la matrice extracellulaire. Cette étape finale dépend aussi des interactions entre les intégrines et les membres de la superfamille des immunoglobulines ;
- enfin, le gradient interstitiel des facteurs chimiotactiques inflammatoires permet la migration cellulaire par mouvements amiboïdes jusqu'au site inflammatoire.

L'augmentation de l'expression d'ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine et P-sélectine a été détectée chez la souris à un niveau maximum 24 h et 7 j après un EME induit par la pilocarpine. Cette augmentation semble directement liée aux crises d'épilepsie puisqu'elle est

largement diminuée lorsque la mise en place de l'EME est évitée par l'administration de diazépam avant la pilocarpine (Fabene et al. 2008).

Dans le cas d'intoxication par le soman chez le rat, une augmentation significative de l'ARNm de molécules d'adhésion a été mise en évidence dans le cortex piriforme, l'hippocampe et le thalamus 2 h (VCAM-1) et 6 h (ICAM-1, E-sélectine) après l'exposition (Williams et al. 2003).

II.1.4 Métabolites et dérivés de l'acide arachidonique

Les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales cérébrales contiennent de nombreux médiateurs de la famille des eicosanoïdes (Warner et Mitchell 2004, Werz 2002) jouant des rôles importants dans la régulation de la transduction du signal et de la transcription génique, mais aussi dans l'induction et l'entretien de la réponse inflammatoire.

Les eicosanoïdes les plus étudiés sont les prostanoides, produits par les COX (White et Hagen 1982). Parmi les prostanoides, on retrouve les prostaglandines (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}), la prostacycline (PGI₂) et le thromboxane (TXA₂).

II.1.4.1 La production d'acide arachidonique par les phospholipases A₂

II.1.4.1.1 Généralités

Les phospholipases A₂ (PLA₂) hydrolysent la liaison ester en position *sn*-2 des phospholipides (Capper et Marshall 2001) (Figure n° 14) pour générer des acides gras libres et des lysophospholipides, qui font partie des médiateurs lipidiques de la réponse inflammatoire (Farooqui et al. 2000, Lee et al. 2004).

Lorsque l'acide gras libéré est l'acide arachidonique (AA), il est métabolisé par les cyclo-oxygénases (COX), les lipoxygénases (LOX) et les époxygénases (EPOX), en prostaglandines, prostacycline, thromboxane, leucotriènes et acides époxyeicosatriénoïques

(Six et Dennis 2000). L'ensemble de ces composés est rassemblé sous le nom d'eicosanoïdes (Figure n° 15).

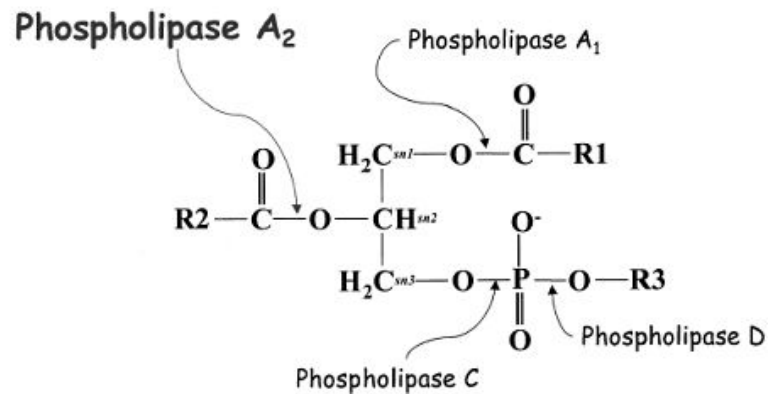


Figure n° 14 : Site d'action des phospholipases.

Les phospholipases A2 (PLA2) hydrolysent la liaison ester en position *sn-2*.
Illustration d'après Capper et Marshall (2001).

Il existe environ 20 PLA2 identifiées dans différents tissus de mammifères (Adibhatla et Hatcher 2008, Adibhatla et al. 2006, Sun et al. 2005). Elles sont classées en trois familles, basées sur leur dépendance au calcium pour produire leur activité catalytique. On trouve ainsi les types calcium-dépendants cytosoliques (cPLA2 α) ou sécrétés (sPLA2) et le type calcium-indépendant (iPLA2) (Akiba et Sato 2004). Les enzymes PLA2 sont ensuite classifiées en sous-groupes en fonction de leur séquence en acides aminés (Balsinde et al. 2002). Les principaux groupes de PLA2 sont présents dans le SNC (Kinsey et al. 2005, Molloy et al. 1998, Sun et al. 2004).

Le rôle des différents sous-types de chaque PLA2, en cas d'atteinte cérébrale, est difficile à élucider en raison du manque de spécificité des inhibiteurs.

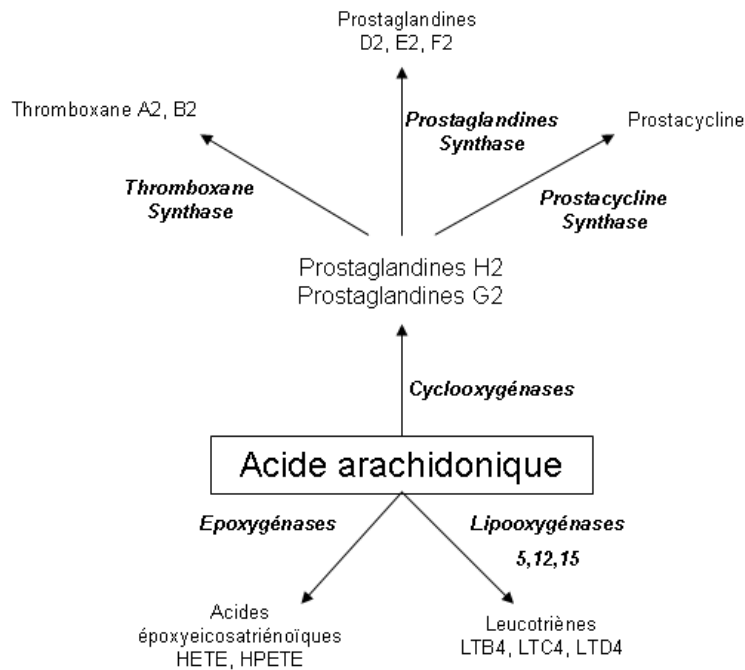


Figure n° 15 : Biosynthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique.

II.1.4.1.2 Production de cPLA2 α et sPLA2 dans le cerveau

L'augmentation du taux de calcium intracellulaire issue de la fixation du glutamate sur ses récepteurs permet la stimulation des PLA2, et en particulier la cPLA2 α .

L'étude de l'expression de l'ARNm de cPLA2 α par hybridation *in situ* ou par *northern blot* a permis de mettre en évidence une expression basale dans le cerveau de rats témoins dans différentes régions incluant le cortex, les zones CA1 et CA3 de l'hippocampe et le GD (Kishimoto et al. 1999, Owada et al. 1994). Les atteintes du SNC, et en particulier les crises d'épilepsie, induisent l'expression et activent la cPLA2 α , aboutissant au relargage d'AA (Farooqui et al. 2006). Dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire chez le rat, une nette augmentation de l'ARNm de cPLA2 α a été mise en évidence par hybridation *in situ* dans le GD entre 12 h et 24 h après l'ischémie. Dans l'hippocampe, seule une légère augmentation de l'ARNm de cPLA2 α a été mise en évidence dans les zones CA1 et CA3 de l'hippocampe entre 6 h et 12 h, avec un retour à la normale observé après 24 h (Owada et al. 1994). Dans un autre modèle d'ischémie transitoire chez le rat, une augmentation de l'immunoréactivité de

cPLA2 α a pu être mise en évidence 24 h et 72 h après l'ischémie dans les cellules microgliales et astrocytaires dans les zones de neurodégénération, et en particulier dans la zone CA1 de l'hippocampe (Clemens et al. 1996).

Dans le cas d'un EME induit par l'administration systémique d'acide kaïnique chez le rat, une augmentation de l'expression de la protéine cPLA2 α a été détectée dans les corps cellulaires des neurones dégénérés de la couche pyramidale de CA1 et CA3 entre 24 h et 72 h après l'induction de l'EME. L'augmentation de l'expression de cPLA2 α n'a été mise en évidence dans les cellules gliales que plus tardivement, à partir de 7 j et jusqu'à 11 semaines dans les astrocytes de la région hippocampique (Sandhya et al. 1998).

La famille des sPLA2 comprend 10 isoformes parmi lesquelles plusieurs enzymes numérotées IIA, IIC, IID, IIE, IIF et V, regroupées dans la sous-famille sPLA2 II. La sPLA2 IIA est connue depuis longtemps pour son implication dans les ischémies cérébrales. En effet, une étude de l'expression de l'ARNm de sPAL2 IIA dans le cerveau de rat, dans un modèle d'ischémie, a permis de révéler une augmentation bi-phasique de la présence de l'ARNm recherché. Une première augmentation a pu être détectée entre 1 h et 6 h post-ischémie, puis entre 7 j et 20 j, après un retour à la normale (Lauritzen et al. 1994).

La comparaison des variations des sPLA2 avec d'autres modèles de dommages cérébraux se heurte au grand nombre d'isoformes de cette enzyme sécrétée. Des études préliminaires par RT-qPCR dans notre laboratoire ont montré que parmi différentes sPLA2 (sPLA2 IIE, sPLA2 F et sPLA2 V), seule la concentration de la sPLA2 IIE est modifiée dans notre modèle d'EME entre 30 min et 7 j. Notre étude a donc été restreinte à l'évaluation des variations de la concentration en ARNm de la sPLA2 IIE, dont l'induction a été constatée dans d'autres modèles expérimentaux d'atteinte cérébrale et en particulier dans des modèles d'EME (Hamaguchi et al. 2003, Kolko et al. 2006, Murakami et al. 2002).

Au-delà de leur action par l'intermédiaire de l'hydrolyse des phospholipides, certaines sPLA2 semblent agir après fixation sur des récepteurs membranaires qui ont été identifiés initialement en utilisant des sPLA2 de venins de serpents (Lambeau et al. 1989). Ce mode d'action a par la suite été largement étudié. Il a été montré que la fixation sur ces récepteurs est impliquée dans la stimulation exercée par les sPLA2 sur les cellules inflammatoires (Hanasaki 2004, Triggiani et al. 2006).

II.1.4.1.3 Interrelations cytokines-PLA2-Glu

Il existe de nombreuses interactions entre les PLA2 et les cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, la cytotoxicité de TNF α a pu être atténuée *in vitro* en inhibant l'expression des cPLA2 α , ce qui indique que l'activité cytotoxique de TNF α est modulée par l'intermédiaire des cPLA2 α (Hayakawa et al. 1993, Rath et Aggarwal 1999). D'autre part, des études *in vitro* ont montré que la présence de TNF α (Anthonsen et al. 2001) et de l'IL-1 α/β (Sun et al. 2005, Wang et Shuaib 2002) augmente l'activité des sPLA2. Enfin, l'utilisation d'anticorps anti-TNF α et d'IL-1ra a permis de prouver que l'expression de la protéine sPLA2 IIA était induite par l'IL-1 α/β et le TNF α (Adibhatla et Hatcher 2007).

Les enzymes de la famille des PLA2 sont par ailleurs susceptibles de jouer un rôle dans les modèles d'EME caractérisés par une libération excessive de glutamate. En effet, les cPLA2 et les phospholipases A2 indépendantes du calcium (iPLA2) sont capables de modifier la phosphorylation des sous-unités GluR des récepteurs AMPA. Ces modifications ont un impact sur la composition synaptique et extra-synaptique en récepteurs AMPA, susceptible de moduler les effets des variations de concentration de glutamate sur la réponse neuronale et les phénomènes excitotoxiques induits (Menard et al. 2005a, Menard et al. 2005b, Menard et al. 2007).

II.1.4.2 La synthèse des prostaglandines

II.1.4.2.1 Les cyclo-oxygénases

Les COX sont des enzymes bi-fonctionnelles à noyau hème occupant une place centrale au sein du métabolisme de l'AA. Elles possèdent deux centres catalytiques couplés fonctionnellement (Jiang et al. 2004) : un centre cyclo-oxygénasique formant l'hydroxyendoperoxyde PGG₂, et un centre peroxydasique qui réduit la PGG₂ en PGH₂.

Trois isoformes des COX ont été mises en évidence dans les tissus des mammifères, désignés COX-1, COX-2 et COX-3. COX-1 est exprimée de manière constitutive dans les neurones et les cellules gliales. COX-2 est aussi exprimée à faible niveau dans le cerveau sain (Hoffmann 2000). En effet, la présence d'une faible immunoréactivité basale de COX-2 dans l'hippocampe, le cortex piriforme et l'amygdale a déjà été décrite dans les neurones et les cellules gliales chez la souris et le rat (Andreasson et al. 2001, Samad et al. 2001, Sandhya et al. 1998). COX-3, dont l'activité est moins puissante que les deux autres isoformes, est un variant d'épissage de COX-1 (Davies et al. 2004, Kam et So 2009).

Contrairement à COX-1, l'expression de COX-2 est fortement inductible. L'expression basale de COX-2 semble régulée par l'activité synaptique glutamatergique dans le cerveau adulte (Adams et al. 1996, Chen et al. 1995, Marcheselli et Bazan 1996). La relation entre la stimulation excessive des récepteurs du glutamate et l'expression neuronale de COX-2 a été mise en évidence dans de nombreux modèles d'atteinte du SNC (Hewett et al. 2000, Strauss et Marini 2002, Strauss et al. 2000). Différentes études *in vivo* ont montré que la régulation génique de COX-2 dans le cerveau était spécifiquement régulée par le glutamate (Candelario-Jalil et al. 2002, Hirst et al. 1999, Koistinaho et al. 1999, Miettinen et al. 1997). Ainsi, le niveau d'expression basal de COX-2 dans des cultures de neurones peut être supprimé en utilisant différents antagonistes des récepteurs du glutamate (Strauss et Marini 2002). Inversement, la surexpression de l'ARNm de COX-2 peut être obtenue dans des cultures de

neurones de rat en utilisant le glutamate, l'acide kaïnique ou le NMDA à des concentrations toxiques (Hewett et al. 2000, Strauss et Marini 2002). Différents types de récepteurs du glutamate sont susceptibles d'intervenir puisque la synthèse de COX-2 semble être induite, avec une efficacité décroissante, par la stimulation des récepteurs kaïnate, NMDA et AMPA (Strauss 2008). Au-delà de la stimulation des récepteurs du glutamate, d'autres mécanismes semblent induire l'expression de COX-2, tels que l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (Adams et al. 1996, O'Banion 1999) ou des ERO (Feng et al. 1995).

En cas d'atteinte neuronale, l'expression de COX-2 est précoce, ce qui laisse supposer que COX-2 pourrait être impliquée dans les mécanismes neuropathologiques. Ce lien entre suractivation des récepteurs du glutamate, surexpression de COX-2 et morts cellulaires retardées associées à des déficits fonctionnels a été démontré dans différents modèles d'atteinte cérébrale (Collaco-Moraes et al. 1996, Hewett et al. 2000, Kunz et Oliw 2001, Strauss et Marini 2002, Strauss et al. 2000).

L'augmentation de l'expression de COX-2 aboutit à une augmentation de la production des PGs qui ont des effets variés et antagonistes. Il est ainsi difficile d'aboutir à un consensus sur l'impact global de la régulation des enzymes de la voie des eicosanoïdes dans le cas de dommages cérébraux, et en particulier en cas d'EME.

Différentes études concernant le rôle de COX-2 dans l'initiation et l'entretien des crises d'épilepsie ont conduit à des résultats contradictoires. L'inhibition de COX-2 après le début de l'EME semble avoir une action neuroprotectrice (Chen et al. 1995, Jung et al. 2006, Kawaguchi et al. 2005, Kunz et Oliw 2001), mais une aggravation des processus lésionnels a aussi été décrite dans des conditions similaires (Kim et al. 2008). L'utilisation d'un inhibiteur de COX-2 avant le début de l'EME induit par l'acide kaïnique conduit à une aggravation des crises (Baik et al. 1999, Gobbo et O'Mara 2004, Kim et al. 2008). Le moment de l'administration de l'inhibiteur semble donc avoir un impact majeur sur son action pro ou

anti-épileptogène, ainsi que sur son action protectrice ou délétère sur les lésions cérébrales. L'explication de ce phénomène peut être en lien avec la modulation de la production des différentes PGs qui ont des effets variables et antagonistes (Liang et al. 2007, Strauss 2008).

La surexpression cérébrale de COX-2 a été soulignée dans différents modèles d'EME (Cole-Edwards et Bazan 2005, Kawaguchi et al. 2005, Turrin et Rivest 2004). Suite à l'induction d'un EME par administration systémique d'acide kaïnique, l'expression de l'ARNm de COX-2 est maximale dans le cortex piriforme et l'hippocampe après un délai de 3 h à 4 h (Chen et al. 1995). L'augmentation de l'expression de la protéine COX-2 apparaît dans les neurones de l'hippocampe dès la 2^e heure suivant le début des crises, elle atteint un niveau maximal à 12 h et 24 h (Kawaguchi et al. 2005). On retrouve une augmentation de l'expression de COX-2 dans les astrocytes des mêmes régions à des temps plus tardifs, entre 1 et 11 semaines après l'EME initial (Sandhya et al. 1998).

Dans le cas d'un EME induit par une dose convulsivante de soman chez le rat, l'utilisation d'une technique de microarray a permis de montrer une augmentation des ARNm dans l'hippocampe avec un maximum entre 9 h et 12 h post-intoxication (Dillman et al. 2009). Des techniques d'immunohistochimie ont révélé une augmentation significative de l'expression de la protéine COX-2 dans le même modèle, à partir de 24 h et jusqu'à 7 j dans le GD, CA3, l'amygdale et le cortex piriforme (Angoa-Perez et al. 2010). Des études menées dans notre laboratoire par hybridation *in situ* ont montré une augmentation du taux d'ARNm de COX-2 dans de nombreuses zones cérébrales, notamment dans les structures limbiques de souris intoxiquées par une dose convulsivante de soman. Dans l'aire CA3 et le cortex piriforme, l'augmentation maximale a été constatée à 6 h pour l'ARNm et entre 6 h et 24 h pour la protéine (données non publiées).

II.1.4.2.2 *Prostaglandines synthases*

Les principales PG présentes dans le SNC sont la PGE₂ et la PGD₂, synthétisées par différentes isoformes de la PGE-synthase (PGES) et de la PGD-synthase (PGDS). Nous nous sommes principalement intéressés à la PGE-synthase microsomale de type 1 (mPGES-1) et à la PGD-synthase hématopoïétique (hPGDS).

Une augmentation significative de la PGE₂ a été constatée dans l'hippocampe 24 h après un EME induit par l'administration systémique d'acide kaïnique chez le rat (Kawaguchi et al. 2005). Chez le même animal, le niveau de la PGE₂ a atteint un niveau maximal entre 24 h et 48 h après exposition au sarin : une 2^e phase d'élévation retardée apparaît un mois après l'exposition initiale (Chapman et al. 2006), et perdure jusqu'à 6 mois post-intoxication (Grauer et al. 2008).

II.1.4.2.2.1 **mPGES-1**

L'augmentation de la concentration de la PGE₂ a été mise en évidence dans différents modèles d'atteintes cérébrales, et en particulier après un EME induit par le sarin (Chapman et al. 2006). L'enzyme terminale aboutissant à la synthèse de la PGE₂ est la PGES, dont il existe trois isoformes : la PGES cytosolique (cPGES), et deux isoformes membranaires mPGES-1 et mPGES-2. L'isoforme de la PGES la plus active dans le cerveau après l'apparition de crises d'épilepsie n'étant pas connue, et les isoformes cPGES et m-PGES-2 n'étant pas inductibles, nous nous sommes concentrés sur l'expression de la mPGES-1 dont l'induction couplée à celle de COX-2 a été montrée dans le SNC en cas de fièvre ou de phénomènes inflammatoires (Inoue et al. 2002, Yamagata et al. 2001).

La synthèse de la mPGES-1, exprimée de manière constitutive dans les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales (Chaudhry et al. 2008), est induite dans les mêmes types cellulaires dans un modèle d'ischémie transitoire chez la souris (Ikeda-Matsuo et al.

2006). Inversement, dans le cas d'un modèle de SE induit chez le rat (micro-injection intracérébrale d'acide kaïnique), l'augmentation de mPGES-1 a été principalement mise en évidence dans les cellules endothéliales, mais pas dans les neurones ou les astrocytes (Takemiya et al. 2010).

La présence de PGE₂ augmente l'excitabilité neuronale hippocampique (Chen et Bazan 2005) et favorise les morts neuronales après un EME induit par l'administration systémique d'acide kaïnique (Takemiya et al. 2006).

II.1.4.2.2.2 hPGDS

La hPGDS est responsable dans le cerveau de la production de la PGD₂ et de son métabolite, la 15d-PGJ₂, par les cellules microgliales, principalement lorsqu'elles sont activées ou amiboïdes (Mohri et al. 2003). L'expression de la hPGDS est fortement augmentée, essentiellement dans les cellules microgliales, dans un modèle d'ischémie chez la souris (Liu et al. 2009). La PGD₂ a montré une action neuroprotectrice dans un modèle murin d'ischémie (Taniguchi et al. 2007). Cette action neuroprotectrice semble s'exercer par l'inhibition de la production d'iNOS et par la limitation de l'infiltration du parenchyme par les macrophages circulants (Liu et al. 2009). La PGD₂ endogène semble par ailleurs avoir des propriétés antiépileptiques en augmentant le seuil de déclenchement des crises d'épilepsie et en limitant leur propagation (Akarsu et al. 1998).

II.2 Lésions cérébrales, épilepsie, excitotoxicité et inflammation centrale

Les relations entre les crises d'épilepsie, les morts cellulaires et la réaction inflammatoire centrale sont complexes. La Figure n° 16 tente de schématiser les différentes voies impliquées.

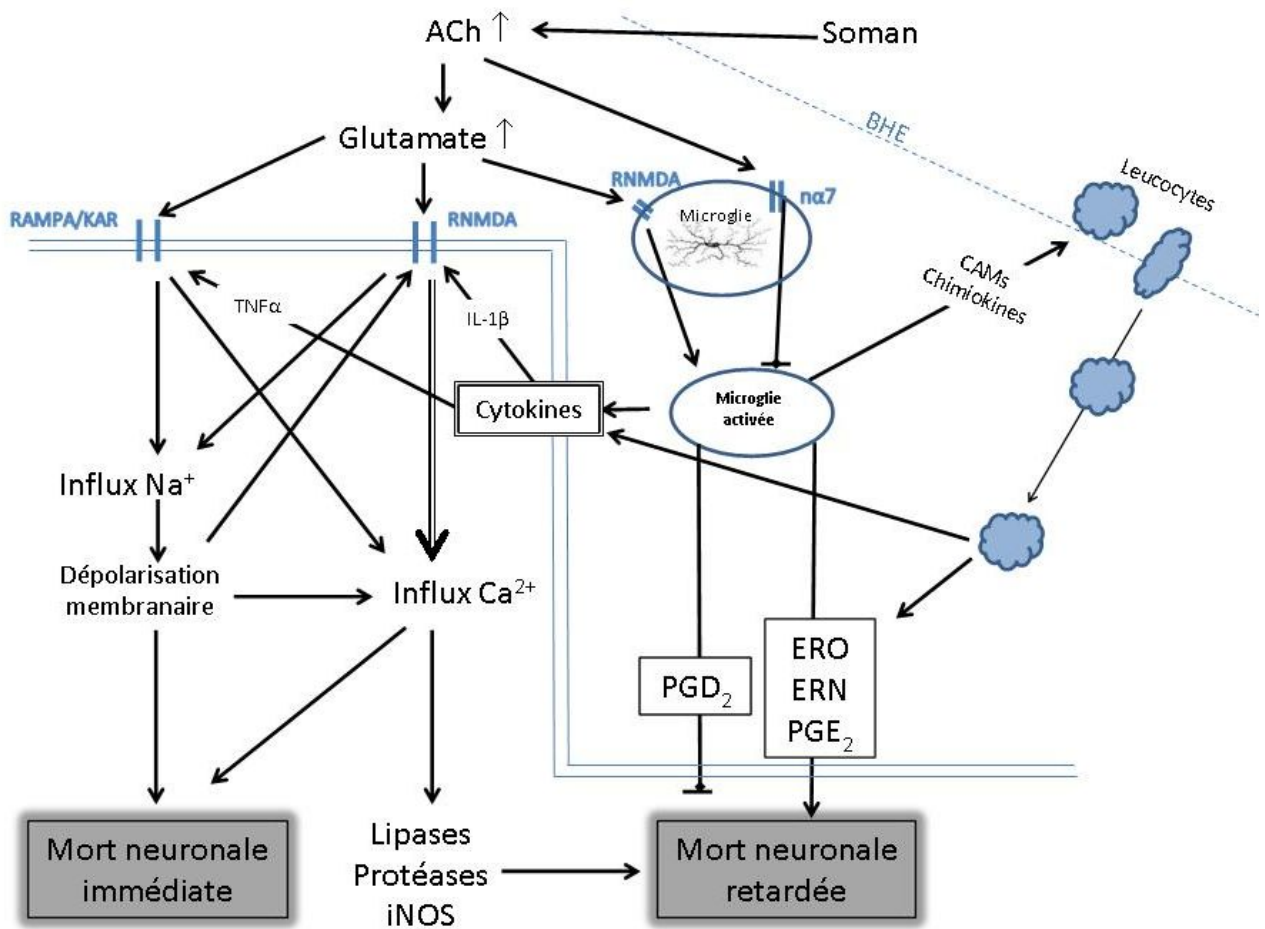


Figure n° 16 : Schéma simplifié des interrelations neuro-inflammatoires moléculaires et cellulaires impliquées dans un EME induit par le soman. Illustration inspirée de Degos (2009).

II.2.1 Cytokines, cellules gliales et épilepsie : effets protecteurs ou délétères ?

De nombreuses études indiquent une action délétère des médiateurs inflammatoires, produits principalement par les cellules gliales, sur la survie neuronale (Allan et al. 2005). Ces effets nocifs s'exercent par leur capacité à provoquer une augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate en agissant sur sa libération et sa recapture, en potentialisant le fonctionnement des récepteurs ionotropes du glutamate (Beattie et al. 2002, Viviani et al. 2003) et en favorisant la production de molécules toxiques, telles que des médiateurs du stress oxydant (Allan et Rothwell 2001, Wang et Shuaib 2002) ou en augmentant l'excitabilité

neuronale (Allan et al. 2005, Vezzani et Granata 2005). Cependant, l'impact de la réaction inflammatoire sur la survie neuronale semble dépendre d'un équilibre entre les différents paramètres que sont la concentration tissulaire des médiateurs de l'inflammation, la durée d'exposition au stimulus inflammatoire et la balance entre les mécanismes pro- ou anti-inflammatoires induits par les différents médiateurs (Bernardino et al. 2005, Vezzani et al. 2008). De la même façon, les cellules microgliales prolifèrent et migrent vers les sites de lésions neuronales où elles contribuent à l'aggravation des dommages cellulaires par la libération de molécules neurotoxiques et de cytokines pro-inflammatoires (Chao et al. 1995). Inversement, elles peuvent favoriser la survie et la récupération fonctionnelle neuronales, notamment par le nettoyage des débris cellulaires (Rapalino et al. 1998) et la libération de facteurs neurotrophiques (Schwartz et al. 2006). D'autres fonctionnalités neuroprotectrices des cytokines pourraient passer par différents mécanismes tels que i) l'induction de la synthèse par le TNF α de protéines capteurs de Ca²⁺ modulant ainsi la réponse calcique au glutamate (Cheng et al. 1994) ou ii) la diminution *via* le TNF α de l'impact de la libération d'ERO par la synthèse de protéines du type super-oxyde dismutase (SOD) (Mattson 1997).

II.2.2 Interrelations entre cerveau, inflammation périphérique et épilepsie

Les lésions cérébrales conduisent à la mise en place d'un processus inflammatoire localisé. Le parenchyme cérébral n'est cependant pas totalement isolé et peut subir l'influence de signaux périphériques pro-inflammatoires.

L'inflammation périphérique peut atteindre directement le SNC par l'intermédiaire de médiateurs de l'inflammation qui pénètrent dans le cerveau (Dantzer et al. 2000, Rivest et al. 2000).

Une augmentation de la perméabilité de la BHE ou des mécanismes de transport actifs peut conduire des cellules circulantes vers l'intérieur du parenchyme cérébral, ce qui

entretient la réaction inflammatoire et l'EME. L'activation des cellules recrutées entraîne notamment la production de chimiokines et de cytokines comme l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF α qui maintiennent et amplifient la réponse inflammatoire.

Les médiateurs protéiques peuvent aussi pénétrer dans le cerveau en passant par les espaces dépourvus de BHE : plexus choroïdes et organes circumventriculaires (neurohypophyse, éminence médiane, organe vasculaire de la lame terminale, organe subfornical, épiphyse et area postrema) (Buller 2001, Ransohoff et al. 2003). L'entrée dans le tissu cérébral peut aussi impliquer des mécanismes de transport actif de la BHE (Vitkovic et al. 2000b), comme cela a été décrit pour TNF α (Pan et al. 2007). Les protéines circulantes de l'inflammation peuvent aussi agir indirectement sur le tissu cérébral en stimulant la iNOS ou COX-2 des cellules de l'endothélium vasculaire qui vont produire d'autres médiateurs de l'inflammation tels que le NO ou des PGs (Laflamme et al. 1999, Rivest et al. 2000, Szelenyi 2001).

Après un EME induit par la pilocarpine chez le rat, une augmentation de la perméabilité de la BHE a été constatée, ainsi qu'une augmentation de la concentration sérique d'IL-1 β (Marchi et al. 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'augmentation de l'expression intracérébrale de l'IL-1 β favorise la perméabilité de la BHE (Shaftel et al. 2007). Ainsi, les conséquences inflammatoires de l'augmentation de la concentration sérique de l'IL-1 β semblent jouer un rôle important dans l'initiation, l'intensité des crises d'épilepsie et les dommages associés.

La réaction inflammatoire est susceptible d'augmenter la perméabilité de la BHE, ce qui peut conduire à une altération de l'homéostasie tissulaire cérébrale. Ainsi, le passage vers le parenchyme cérébral de protéines sanguines telles que l'albumine (van Vliet et al. 2007), les immunoglobulines G (IgG) (Rigau et al. 2007), ou des modifications de l'équilibre ionique telles qu'une augmentation de la concentration de K⁺ (Uva et al. 2008) ont été mis en

évidence dans différents modèles d'EME. Ces modifications semblent augmenter l'excitabilité neuronale et favoriser le développement de l'épileptogenèse à la suite d'un EME initial (Ivens et al. 2007, Seiffert et al. 2004). En outre, les conséquences d'un EME induit par la pilocarpine chez la souris (lésions cellulaires, développement de crises spontanées...) sont d'autant plus importantes que l'EME est accompagné d'un passage de cellules circulantes vers le parenchyme cérébral, contribuant à l'entretien de la réaction inflammatoire et à la perméabilité de la BHE (Figure n° 17) (Kleen et Holmes 2008). Les interrelations leucocyte-endothélium vasculaire, médiées par les molécules d'adhésion des vaisseaux sanguins (ICAM-1, VCAM-1, sélectines-P, sélectines-P) et leurs ligands à la surface des cellules circulantes (intégrines, sélectines-L), semblent donc avoir un impact sur les conséquences d'un EME. Dans ce même modèle d'EME, la limitation de l'infiltration des leucocytes par la prévention de leur adhésion à l'endothélium vasculaire a permis de diminuer la récurrence des crises consécutives à un EME initial ainsi que les lésions cellulaires associées (Fabene et al. 2008).

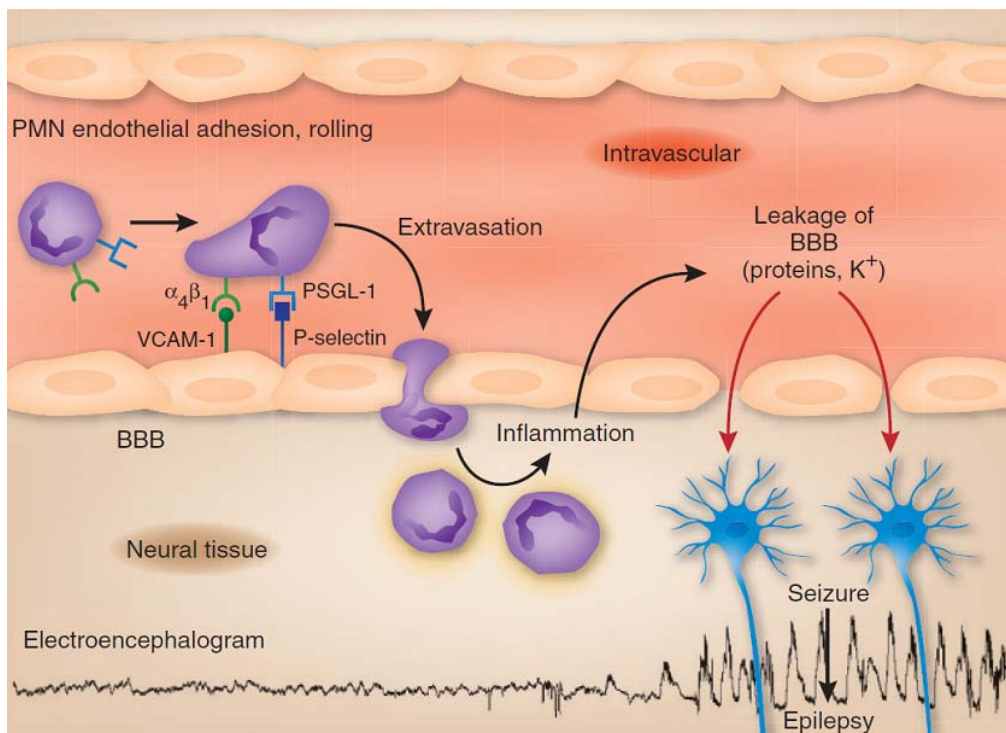


Figure n° 17 : Infiltration du parenchyme cérébral par les GNN.
Illustration d'après Kleen et Holmes (2008).

Les caractéristiques de la réponse inflammatoire périphérique après intoxication par le soman ont été peu étudiées (Sevaljevic et al. 1992, Sevaljevic et al. 1987). Une démargination leucocytaire a cependant été mise en évidence suite à une augmentation de la concentration sanguine des leucocytes circulants (Collombet et al. 2005). Comme dans le cas des autres affections centrales accompagnées d'un syndrome inflammatoire périphérique, la réaction inflammatoire centrale est probablement favorisée par d'éventuelles protéines inflammatoires circulantes pouvant agir sur le SNC, et par la circulation d'une plus grande quantité de leucocytes susceptibles de franchir la BHE.

III. Moyens de prévention ou de contrôle de la neuro-inflammation

Considérant l'importance des conséquences du développement d'une réaction inflammatoire sur le parenchyme cérébral, il semble indispensable de prendre en compte ce paramètre dans les stratégies de lutte contre les lésions neuronales.

III.1 Impact de la modulation de l'inflammation sur les lésions cérébrales

III.1.1 Utilisation de traitements anti-inflammatoires

Les corticoïdes ont été largement utilisés dans le traitement des lésions du SNC. Leurs propriétés anti-inflammatoires reposent sur l'inhibition de la peroxydation et de l'hydrolyse lipidiques. Des données expérimentales plaident en faveur d'une action neuroprotectrice des corticostéroïdes dans des modèles de traumatisme crânien (Hall 1985). En revanche, les données cliniques sont plus contrastées. Les connaissances actuelles semblent désormais montrer que les glucocorticoïdes sont inefficaces dans le traitement des accidents vasculaires cérébraux, des traumatismes crâniens et des hémorragies méningées (Gomes et al. 2005).

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ne font généralement pas partie des traitements mis en œuvre pour traiter les patients atteints d'épilepsie, à l'exception des situations dont l'origine est infectieuse ou inflammatoire. Cependant, l'efficacité des stéroïdes a été mise en évidence pour prévenir le développement de l'EME chez la souris après administration de pilocarpine (Kokate et al. 1996). Par ailleurs, une étude clinique récente a permis de démontrer l'efficacité de différents immunomodulateurs stéroïdiens (prednisolone, ACTH, hydrocortisone ou dexaméthasone) dans le traitement de cas pédiatriques d'épilepsie résistante aux traitements habituels (Marchi et al. 2009). On remarque que les traitements employés dans cette étude sont efficaces pour limiter la production de cytokines pro-inflammatoires, et en particulier celle de l'IL-1 β .

L'utilisation d'AIS est cependant accompagnée d'effets secondaires qui ne permettent que rarement d'en envisager une utilisation prolongée.

L'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) a fait l'objet d'études en cas de lésions cérébrales, en particulier dans des modèles de crises d'épilepsie. L'étude de l'efficacité des anti-COX-2 dans l'initiation et le maintien des crises d'épilepsie a conduit à des résultats contradictoires. Le moment de l'administration de l'inhibiteur semble avoir un impact majeur sur son action pro- ou anti-épileptogène, ainsi que sur son action protectrice ou délétère sur les lésions cérébrales. En effet, l'inhibition de COX-2 après le début de l'EME semble avoir une action neuroprotectrice (Chen et al. 1995, Jung et al. 2006, Kawaguchi et al. 2005, Kunz et Oliw 2001), bien qu'une aggravation des processus lésionnels ait aussi été décrite dans des conditions similaires (Kim et al. 2008). Inversement, l'utilisation d'un inhibiteur de COX-2 avant le début de l'EME conduit à une aggravation des crises induites par l'acide kaïnique (Baik et al. 1999, Gobbo et O'Mara 2004, Kim et al. 2008). Des expérimentations réalisées dans notre laboratoire ne semblent pas montrer d'effets majeurs des anti-COX-2 sur les lésions cellulaires ou la mortalité induites par le soman chez la souris.

Des effets neuroprotecteurs ont par ailleurs été mis en évidence chez le souriceau en cas d'utilisation d'inhibiteurs de COX-2 après administration systémique d'acide iboténique, un neurotoxique non convulsivant (Favrais et al. 2007).

Ces effets apparemment contradictoires des anti-COX-2, et l'influence de la chronologie du traitement sur le type de réponse obtenue, sont probablement liés à l'action de COX-2 sur la synthèse de différents types de PGs (PGE₂, PGD₂...) qui ne sont pas produites en même quantité et au même moment au cours de l'ictogénèse (Naffah-Mazzacoratti et al. 1995), et peuvent avoir des effets antagonistes (Liang et al. 2007, Scher et Pillinger 2009, Strauss 2008).

III.1.2 Modulation de la communication entre le cerveau et la circulation périphérique

Il a récemment été montré que la limitation de l'infiltration du parenchyme cérébrale par les GNN permettait de limiter la récurrence des crises induites et leurs conséquences dans un modèle d'EME chimio-induit par la pilocarpine chez la souris (Fabene et al. 2008). A la suite d'un EME, il est donc possible de prévenir le passage des cellules immunitaires circulantes à travers la BHE en limitant les interrelations leucocyte-endothélium vasculaire. Ces dernières passent par les molécules d'adhésion des vaisseaux sanguins (ICAM-1, VCAM-1, sélectines-P, sélectines-E) et leurs ligands à la surface des cellules circulantes (intégrines). L'adhésion des leucocytes à la paroi des vaisseaux du SNC a pu être inhibée en utilisant un anticorps dirigé contre l'intégrine $\alpha 4$ ou la *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1* (PSGL-1), présents à la surface des leucocytes, ou contre leurs principaux ligands vasculaires respectifs, VCAM-1 ou sélectine-P (Fabene et al. 2008).

Le recours à des anticorps ciblant les molécules d'adhésion (Luster et al. 2005) pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante afin de lutter contre les complications d'un EME initial.

III.1.3 Modulation de l'interaction entre l'IL-1 β et sa cible

Comme nous l'avons vu précédemment, les cytokines pro-inflammatoires – en particulier l'IL-1 β – ont un impact sur la sensibilisation aux mécanismes d'excitotoxicité (Allan et Rothwell 2001). L'utilisation de l'IL-1ra, antagoniste spécifique de l'IL-1 β , constitue donc un moyen de lutte contre l'inflammation centrale. Cet antagoniste spécifique est produit naturellement à la suite d'une lésion cérébrale. Dans un modèle d'EME utilisant la biccuculine, l'injection d'IL-1ra ou l'utilisation de souris transgéniques surexprimant l'IL-1ra astrocytaire ont montré un puissant effet anticonvulsivant de cette molécule (Vezzani et al. 2000). Dans d'autres modèles, l'administration de l'IL-1ra par voie intraveineuse ou intracérébroventriculaire réduit l'importance des lésions dans différents modèles d'ischémie chez le rat (Garcia et al. 1995, Loddick et Rothwell 1996). Inversement, une ischémie chez des souris transgéniques délétées pour le gène de l'IL-1ra conduit à une augmentation de la taille des lésions (Pintaux et al. 2006). Chez des rats immatures, l'administration intrapéritonéale d'IL-1ra limite le développement rapide de l'épileptogenèse induite par l'administration de LPS combinée à une stimulation électrique de l'hippocampe (Auvin et al. 2010). Enfin, chez l'homme, la concentration de l'IL-1ra mesurée par microdialyse est corrélée à une diminution de la pression intracrânienne et semble constituer un pronostic favorable pour l'évolution clinique des patients cérébrolésés (Hutchinson et al. 2007).

Une augmentation de la concentration sérique de l'IL-1 β a été mise en évidence après un EME induit chez le rat par administration de pilocarpine (Marchi et al. 2007). L'augmentation de cette cytokine en dehors du SNC semble jouer un rôle important dans le déroulement des crises d'épilepsie. En effet, dans le même modèle, l'administration systémique préventive d'IL-1ra conduit à une diminution de l'intensité des crises et à une diminution de la perméabilité de la BHE (Marchi et al. 2009).

L'IL-1ra semble donc représenter une piste thérapeutique intéressante. En effet, administrée par voie systémique après un EME, elle peut agir à la fois sur la réponse inflammatoire périphérique, sur la perméabilité de la BHE associée à l'inflammation, mais aussi directement sur la neuro-inflammation centrale car l'IL-1ra peut traverser la BHE (Clark et al. 2008).

III.2 Anesthésiques généraux, neuroprotection et inflammation

Les anesthésiques généraux, en raison de leurs effets directs sur la transmission glutamatergique et GABAergique, ont une action neuroprotectrice qui a été mise en évidence chez l'animal (Degos et al. 2008).

Par ailleurs, certaines molécules utilisées en anesthésie comme le thiopental, le midazolam ou la kétamine ont des effets immunomodulateurs périphériques *in vivo* et *in vitro* (Albanese et al. 2004). Ils sont capables d'inhiber les principaux mécanismes impliqués dans la réponse immunitaire comme le chimiotactisme, l'adhérence des neutrophiles, la phagocytose et le relargage de radicaux libres (Nishina et al. 1998).

Un effet anti-inflammatoire a aussi été montré pour le propofol qui inhibe la production de PGE₂ par les monocytes/macrophages humains stimulés par le LPS *in vitro* (Kambara et al. 2009). Il n'existe cependant pas d'étude sur l'impact des anesthésiques généraux sur la réponse immunitaire cérébrale isolée ni sur la réponse immunitaire dans le cadre d'une lésion cérébrale aiguë (Degos et al. 2009).

La kétamine, en raison de ses propriétés anti-glutamatergiques et anti-inflammatoires, pourrait représenter une piste thérapeutique envisageable pour la prise en charge des affections cérébrales, en particulier lorsqu'elles sont la conséquence d'un EME. Nous développerons cet aspect dans le prochain chapitre.

Chapitre 4 – La kétamine

I. Rappels pharmacologiques

I.1 Nature moléculaire

I.1.1 Une molécule dérivée de la phencyclidine

La kétamine (Figure n° 18), ou 2-(o-chlorophényl)-2-(méthylamino)-cyclohexanone, est une arylcycloalkylamine dérivée de la phencyclidine (PCP), synthétisée pour la première fois en 1962. Elle est soluble en solution aqueuse et présente aussi une forte liposolubilité.

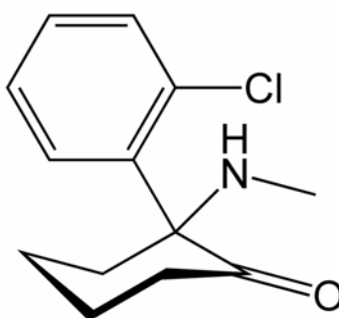


Figure n° 18 : Structure moléculaire de la kétamine.

I.1.2 Deux énantiomères aux propriétés pharmacologiques différentes

La présence d'un atome de carbone asymétrique en C₂ du cycle cyclohexanone induit l'existence de deux énantiomères lévogyre R(-) et dextrogyre S(+) possédant des propriétés pharmacologiques distinctes, principalement en raison d'une différence d'affinité pour chaque type de récepteur.

Plusieurs études sur des modèles animaux ont permis de montrer que la forme dextrogyre S(+) a 4 fois plus d'affinité que l'isomère lévogyre R(-) pour les sites de liaison des récepteurs NMDA (Craven 2007, Deleforge et al. 1991, Klimscha et al. 1998, Kohrs et Durieux 1998). La S(+) kétamine est ainsi deux fois plus efficace que le mélange racémique.

Son index thérapeutique est 2,5 fois plus important que celui du mélange racémique ou de l'énantiomère R(-) seul (Kohrs et Durieux 1998).

Différentes études cliniques comparant la durée d'une anesthésie utilisant le mélange racémique ou l'isomère S(+) montrent que le réveil est plus rapide après administration de l'isomère S(+), quelle que soit la voie d'administration (Adams et al. 1994).

Les effets indésirables de l'anesthésie à la kétamine sont similaires avec le mélange racémique ou l'énantiomère S(+). Cependant, le réveil semble plus confortable et associé à moins de phénomènes hallucinatoires lorsque l'énantiomère S(+) est utilisé (Craven 2007, Kohrs et Durieux 1998).

La S(+) kétamine semble donc présenter de nombreux intérêts en termes de sécurité d'utilisation. L'usage hospitalier de ce composé est autorisé en Europe, mais seule la forme racémique est disponible en France (Adams et al. 1994, Craven 2007, Richebe et al. 2005).

I.2 Pharmacocinétique

En raison de sa forte liposolubilité, la kétamine traverse rapidement la BHE, avant d'être distribuée dans le cerveau ainsi que dans les autres tissus fortement perfusés. La liaison aux protéines plasmatiques, et en particulier à l'albumine, est d'environ 50 % et varie avec le pH : la fixation augmente en alcalose et diminue en acidose. En cas d'administration lors d'un EME, l'acidose sanguine associée est donc susceptible de favoriser une augmentation de la fraction plasmaticque libre de la kétamine.

Après redistribution depuis les différents tissus, la kétamine s'accumule principalement dans le tissu adipeux. Les deux énantiomères semblent également distribués dans les tissus (Knobloch et al. 2006). Leur diffusion rapide à travers les capillaires permet une équilibration rapide dans les compartiments tissulaires (Henthorn et al. 1999).

Grâce à ses propriétés physico-chimiques à la fois hydro et liposolubles, la kétamine peut être administrée par de nombreuses voies : intraveineuse, intra-osseuse, intramusculaire, sous-cutanée, rectale, orale, nasale et épidurale (Craven 2007).

Après une injection intraveineuse, la biodisponibilité est de 90 % alors qu'après une administration orale ou rectale, elle n'est que de 16 %.

Par voie intraveineuse, les effets de la kétamine sont observés très rapidement, moins d'une minute après l'injection. La voie intramusculaire permet d'observer les effets de la kétamine en 1 à 5 min, avec un pic plasmatique atteint après 10 min (Sinner et Graf 2008). Par voie orale, les effets apparaissent après un délai de 15 à 30 min, le pic de concentration plasmatique ne représentant que 1/5^e de celui obtenu après administration parentérale. Ces différences sont dues à une absorption gastro-intestinale incomplète et à l'effet de premier passage hépatique (Craven 2007).

La voie intraveineuse en perfusion continue est le mode d'administration de choix de la kétamine. Utilisée seule, cette dernière présente trois catégories d'effets secondaires : effets psychodysléptiques, augmentation de la pression intracrânienne en situation d'hypercapnie (Himmelseher et Durieux 2005) et état hyperadrénergique. La kétamine est donc généralement utilisée en association avec un autre composé afin de potentialiser son activité, et de limiter ses effets secondaires :

- une benzodiazépine afin de diminuer l'expression des effets psychodysléptiques ;
- un autre hypnotique (benzodiazépine) ou anesthésique (propofol) pour obtenir une narcose plus classique, avec des doses plus faibles, en combinant l'effet sur le récepteur GABA_A au blocage des récepteurs NMDA, afin de tirer parti des effets analgésiques ou neuroprotecteurs de la kétamine et d'éviter l'augmentation de la PIC ;

- un α 2-agoniste afin d'atténuer les manifestations hyperadrénergiques ;
- une prémédication d'atropine pour éviter l'hypersalivation.

Chez le chien, la kétamine est essentiellement transformée dans le foie par les cytochromes P₄₅₀ en différents composés, dont la norkétamine obtenue par N-déméthylation (Mion 2004). Par la suite, le composé R(-) norkétamine est métabolisé rapidement par le foie en plusieurs composés inactifs (Knobloch et al. 2006). Cette transformation est 8 fois plus importante que celle du composé S(+) norkétamine. La concentration du composé S(+) sera donc plus élevée dans la circulation plasmatique et dans les autres tissus. La norkétamine R(-) et S(+), plus hydrophile, est plus rapidement éliminée car elle s'accumule moins que la kétamine dans les tissus.

L'élimination est urinaire sous forme inactive, ou sous forme active chez les espèces ne métabolisant pas la kétamine par voie hépatique.

I.3 Pharmacodynamie

La neuropharmacologie de la kétamine semble complexe en raison des nombreuses interactions possibles avec différents sites de liaison. Le site principal est le récepteur glutamatergique NMDA, mais elle agit aussi sur des récepteurs glutamatergiques non-NMDA, des récepteurs cholinergiques, opioïdes et monoaminergiques. Des interactions ont été décrites avec des canaux ioniques voltage-dépendants tels que les canaux à Na⁺ et Ca²⁺ (Mion 2003).

I.3.1 Action sur les récepteurs au glutamate

I.3.1.1 Antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA

Comme nous l'avons vu précédemment (voir p. 35), le RNMDA est composé de cinq sous-unités protéiques formant un canal ionique central perméable aux ions Ca^{2+} , K^+ et Na^+ . Il existe à l'intérieur du canal des sites de liaison de la PCP/kétamine et de l'ion Mg^{2+} qui se chevauchent partiellement et bloquent tous deux le fonctionnement du récepteur NMDA de manière non compétitive (Figure n° 19).

La fixation de la kétamine sur son site d'action dans le canal du récepteur NMDA entraîne une réduction de la stimulation post-synaptique induite par le glutamate. Le blocage exercé par la kétamine dépend à la fois de sa concentration et de la fréquence de stimulation du récepteur par cet inhibiteur. Dans ce domaine, l'énantiomère S(+) a une affinité 3 à 4 fois plus importante que le R(-) (Hirota et Lambert 1996a, Kohrs et Durieux 1998).

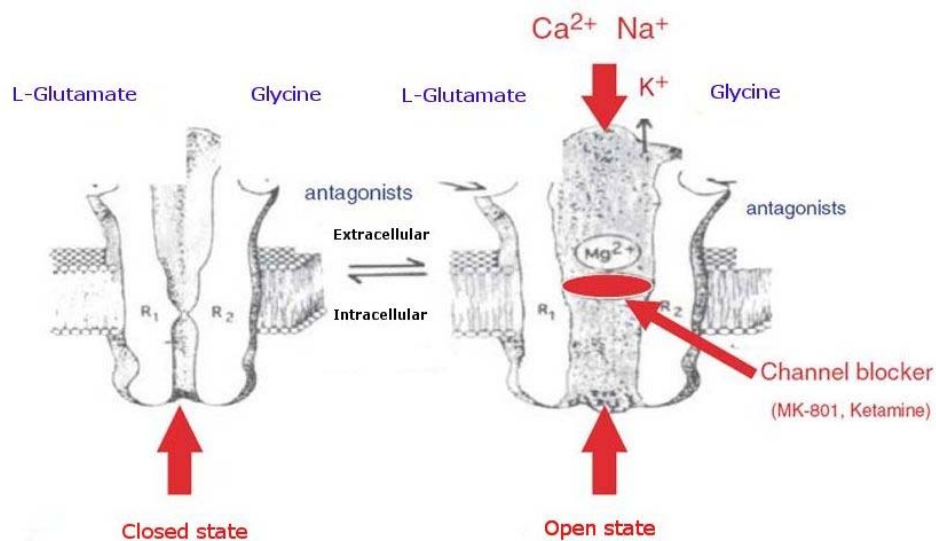


Figure n° 19 : Action de la kétamine sur les récepteurs NMDA.
Illustration d'après Sinner et Graf (2008).

La kétamine n'a généralement pas d'effet sur le maintien des crises épileptiques lorsqu'elle est administrée dans les minutes qui suivent leur initiation. Dans ces conditions,

bien qu'elle ne permette pas de bloquer complètement la survenue de dommages cellulaires cérébraux, elle permet toutefois de limiter significativement les déficits cognitifs induits par l'EME (Santi et al. 2001, Stewart et Persinger 2001).

1.3.1.2 Action sur les récepteurs au glutamate non-NMDA

Des études réalisées sur des cultures de neurones et de cellules gliales de rat ont montré une action inhibitrice de la kétamine sur les récepteurs glutamatergiques non-NMDA (AMPA et KA) (Gonzales et al. 1995).

1.3.2 Action sur le système cholinergique

L'action de la kétamine sur le système cholinergique est complexe, et les expérimentations réalisées à ce jour indiquent des résultats contradictoires, allant vers une tendance à l'augmentation ou à la diminution de la libération de l'ACh dans le SNC.

Aux concentrations utilisables en clinique, la kétamine semble inhiber la libération d'ACh médiée par les récepteurs NMDA pré-synaptiques. Cette inhibition cholinergique centrale semble impliquée dans certains effets indésirables comme la tachycardie (Kohrs et Durieux 1998).

1.3.2.1 Action sur les récepteurs nicotiques

La kétamine n'a pas d'effet direct sur la plaque motrice lorsqu'elle est utilisée isolément, ou un effet mineur en raison de l'action centrale de la kétamine qui majore le tonus musculaire et masque l'inhibition périphérique (Kohrs et Durieux 1998). En revanche, associée à un curare, elle potentialise la dépression de la jonction neuromusculaire chez le primate, par un mécanisme qui paraît indépendant de l'occupation du récepteur nicotique post-synaptique car on n'observe pas de potentialisation du bloc induit par l' α -bungarotoxine

(Tsai et al. 1992). Cet effet dépresseur pourrait passer par une inhibition des récepteurs pré-synaptiques nicotiques $\alpha 7$, limitant la libération post-synaptique d'autres neuromédiateurs excitateurs (Hilmas et Williams 2007).

1.3.2.2 Action sur les récepteurs muscariniques

L'action de la kétamine sur les récepteurs muscariniques apparaît encore mal comprise. Elle pourrait intervenir dans son activité bronchodilatatrice ou dans ses effets favorisant le tonus orthosympathique. Par ailleurs, une étude ancienne chez l'homme, sujette à controverse, a montré que l'utilisation de la physostigmine, un anticholinestérasique qui traverse la BHE, permet d'antagoniser l'anesthésie induite par la kétamine (White et al. 1982).

L'affinité pour les récepteurs muscariniques étant cependant 10 à 20 fois plus faible que pour les récepteurs NMDA, les conséquences de l'action antimuscarinique éventuelle de la kétamine ne sont pas prépondérantes (Mion 2003).

1.3.3 Agoniste des récepteurs opioïdes μ et κ

Les récepteurs opioïdes sont couplés à des protéines G. La kétamine possède une action agoniste après fixation sur ces récepteurs, qui joueraient cependant un rôle mineur dans les effets analgésiques de la kétamine. L'affinité de la kétamine pour les récepteurs opioïdes reste en effet 10 à 20 fois moins importante que pour les récepteurs NMDA (Hirota et Lambert 1996a).

Cependant, l'interaction de la kétamine avec les récepteurs κ expliquerait certains de ses effets indésirables psychomimétiques ou dépresseurs respiratoires, comme le montre une étude utilisant des souris dépourvues de récepteur μ (Sarton et al. 2001).

Il existe des relations fortes entre les récepteurs opioïdes et NMDA. Des travaux suggèrent un système de communication entre ces deux types de récepteurs à la surface des

mêmes cellules. En effet, l'activation du récepteur opioïde favorise la phosphorylation du récepteur NMDA qui aboutit à la levée du bloc magnésien du récepteur NMDA, initiant l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. La sélectivité préférentielle pour les récepteurs NMDA évite d'éventuels effets délétères de la kétamine liés à son action sur les récepteurs opioïdes (Mion 2003).

I.3.4 Action sur les récepteurs monoaminergiques

La kétamine exerce une action très nette sur la libération et la recapture des amines cérébrales, noradrénaline, dopamine et sérotonine (Mion 2003).

I.3.4.1 Action sur les récepteurs noradrénergiques

L'énantiomère R(-) de la kétamine inhibe la recapture neuronale de la noradrénaline ; de manière complémentaire, l'isomère S(+) inhibe la recapture extraneuronale. Cet effet favorise la réponse synaptique prolongée résultant de la libération de noradrénaline et augmente son temps de demi-vie dans la fente synaptique. Il s'ensuit une majoration de ses concentrations plasmatiques dans la circulation sanguine systémique.

I.3.4.2 Action sur les récepteurs dopaminergiques et sérotoninergiques

De la même façon, la kétamine inhibe la recapture de la sérotonine et de la dopamine et augmente leur temps de demi-vie. La kétamine augmente donc l'activité dopaminergique centrale. Ce mécanisme expliquerait en partie ses effets émétisants.

I.3.5 Inhibition générale des courants sodiques et calciques

L'inhibition des canaux sodiques voltage-dépendants procure à la kétamine un effet anesthésique local de faible intensité (Richebe et al. 2005) par une action sur le même site de fixation que les anesthésiques locaux (Wagner et al. 2001).

Dans les neurones, les canaux calciques de type L largement impliqués dans la libération de neurotransmetteurs sont susceptibles d'être bloqués par la dihydropyridine ou le vérapamil. Un effet similaire de la kétamine n'est pas possible aux concentrations utilisées en anesthésie (Hirota et Lambert 1996a, b). Les effets anesthésiques de la kétamine ne sont donc pas susceptibles d'être expliqués par une action sur ces canaux calciques.

Dans les muscles lisses et striés, la kétamine modifie le flux de Ca^{2+} en bloquant ces mêmes canaux calciques de type L, ce qui participe à ses effets vasodilatateurs, bronchodilatateurs et ionotropes négatifs (Baum et Tecson 1991).

II. Kétamine et traitement des intoxications par les neurotoxiques organophosphorés

Comme nous l'avons vu précédemment, lorsque l'EME induit par le soman se prolonge au-delà de 10 à 20 minutes, l'efficacité du diazépam et de l'atropine diminue rapidement (McDonough et Shih 1997). Les oximes réactivatrices des cholinestérases (pralidoxime, HI-6...) utilisées dans le traitement de l'intoxication ne présentent pas d'effets antiépileptiques et sont susceptibles de favoriser la survie de personnes intoxiquées sans stopper l'EME. En cas d'intoxication par les NOP, on peut craindre qu'un certain nombre de victimes partiellement protégées par les traitements mis en œuvre présentent, en cas de survie, de graves séquelles neurologiques. Ce phénomène est déjà bien décrit dans d'autres modèles d'EMER (Chen et Wasterlain 2006).

Les antagonistes des récepteurs glutamatergiques, et en particulier ceux des RNMDA, sont actuellement les seules molécules permettant de stopper l'EME et de limiter les lésions du SNC induites par les NOP lorsque le traitement est initié jusqu'à 60 à 120 minutes après l'intoxication. Des recherches ont été menées depuis de nombreuses années au sein de notre laboratoire sur le MK-801, la TCP, et la gacyclidine. La kétamine étudiée plus récemment, présente non seulement des propriétés similaires mais possède également l'avantage de disposer d'une AMM et d'être utilisée couramment en clinique (Dorandeu et al. 2010).

II.1 Les antagonistes des récepteurs glutamatergiques dans le cadre de la lutte contre les intoxications par les NOP

Le MK-801, ou maléate de dizocilpine, est un antagoniste NMDA fréquemment utilisé expérimentalement. Dans le cas de l'intoxication par le soman, il présente une très bonne activité antiépileptique et neuroprotectrice lors d'une administration combinée avec l'atropine. L'efficacité s'est révélée plus importante en cas d'administration au cours de la 1^{ère} heure suivant le début de l'EME. Une bonne efficacité neuroprotectrice a pu être obtenue en utilisant de fortes doses jusqu'à 2 heures après l'intoxication (Braitman et Sparenborg 1989, McDonough et Shih 1997, McDonough et Shih 1993, Sparenborg 1991, Sparenborg et al. 1992). Ce composé ne peut cependant pas être utilisé chez l'homme en raison de propriétés psychodysléptiques importantes et d'effets neurotoxiques communs à d'autres antagonistes NMDA (Bueno et al. 2003, Sharp et Hendren 2007).

La TCP, ou thiénylcyclohexylpipéridine, est un analogue de la PCP qui traverse facilement la BHE et dispose d'une très forte affinité pour le RNMDA. Après intoxication par le soman, les effets antiépileptiques les plus marqués de la TCP sont obtenus lorsqu'elle est administrée entre 30 et 60 minutes après le début des crises (Carpentier et al. 1991, Carpentier et al. 1994). Cet effet est en accord avec le mode d'action des antagonistes non compétitifs des RNDMA et de la cinétique d'activation de ces récepteurs au cours de l'intoxication par le

soman (Dorandeu et al. 2003). La TCP présente un certain nombre d'avantages par rapport au MK-801 puisqu'elle possède des propriétés psychodysléptiques moindres, n'a pas d'effets neurotoxiques aux doses utilisables en clinique, et n'a pas d'effets déprimeurs respiratoires centraux (Dorandeu et al. 2003).

Le GK-11, ou gacyclidine, dispose de propriétés antiépileptiques et neuroprotectrices mises en évidence chez le primate intoxiqué par le soman, même lorsque le traitement est retardé jusqu'à 45 minutes après l'intoxication. Dans ce contexte, cette molécule prévient les séquelles neuropathologiques qui se développent habituellement dans le cortex et l'hippocampe après l'intoxication. Comme pour les autres composés antagonistes des RNMDA, l'efficacité de la gacyclidine s'est révélée limitée dans le temps, et ne permet pas de stopper la toxicité induite par le soman lorsque le traitement est mis en place 1 h après l'intoxication (Lallement et al. 1999, Lallement et al. 1997b).

L'efficacité de la mémantine dans le traitement de l'intoxication par le soman a été évaluée par McLean et al. (1992) qui ont montré son efficacité pour stopper les crises convulsives en cas d'utilisation 15 min après l'intoxication. Elle a l'avantage de ne pas présenter d'effets neurotoxiques aux doses thérapeutiques et de causer moins d'effets secondaires que les autres anti-NMDA. Son intérêt dans le traitement de l'intoxication par le soman mériterait d'être évalué plus précisément, même si elle n'est pas disponible en France par voie injectable (Dorandeu et al. 2010).

La perte d'efficacité dans le temps est un paramètre que l'on retrouve chez les différents anti-NMDA testés pour lutter contre les effets neuropathiques de l'intoxication par le soman. Ce phénomène pourrait trouver son explication dans la désensibilisation des récepteurs NMDA lorsque l'EME se prolonge. D'autres systèmes de neurotransmission sont impliqués, sur lesquels les anti-NMDA n'auraient pas d'effet (Carpentier et al. 1994).

II.2 Intérêt de la kétamine dans le traitement de l'EME induit par l'intoxication par les NOP

L'efficacité antiépileptique et neuroprotectrice de la kétamine a été testée dans différents modèles d'EME. La kétamine est le seul anti-NMDA injectable disposant d'une Autorisation de mise sur le marché (AMM) chez l'homme en France. Contrairement aux autres antagonistes NMDA, la kétamine ne possède que de faibles propriétés neurotoxiques non rapportées en utilisation clinique courante. Elle possède cependant aussi des effets psychodysléptiques indésirables. Au delà de ses principaux effets antiépileptiques, neuroprotecteurs et anti-inflammatoires, la kétamine possède un certain nombre d'autres caractéristiques intéressantes dans le cadre du traitement de l'intoxication par les NOP (Dorandeu et al. 2010).

II.2.1 Effets antiépileptiques et neuroprotecteurs

Chez l'homme, la kétamine s'est révélée efficace pour traiter les EMER résistants aux traitements anesthésiques habituels, à la dose de 2 mg/kg suivie d'une perfusion jusqu'à 7,5 mg/kg par heure (Sheth et Gidal 1998). Dans le cas du traitement de l'EME induit par le soman, les premiers essais d'évaluation de la kétamine, basés sur une administration unique très rapidement après l'intoxication, n'ont pas permis de révéler son efficacité (Shih et al. 1999). D'autres expérimentations ont été réalisées plus récemment dans notre laboratoire sur le cobaye intoxiqué par 2 DL₅₀ de soman. La kétamine ou la S(+) kétamine a été administrée à différents dosages en association avec le sulfate d'atropine de manière répétée, toutes les 30 min, en raison de la courte durée d'action de la molécule. Ces expérimentations ont permis de montrer l'intérêt d'une administration répétée de kétamine combinée au sulfate d'atropine. Alors que l'utilisation de doses subanesthésiques est efficace lorsque le traitement débute 30 min après l'intoxication, il est nécessaire d'utiliser des doses anesthésiques si le traitement est différé une heure post-exposition. Ainsi, le traitement par une dose anesthésique de kétamine

combinée au sulfate d'atropine (3 injections à 30 min d'intervalle), une heure après l'intoxication, permet la survie de tous les animaux, stoppe les crises d'épilepsie et offre une très bonne neuroprotection, même si elle est incomplète (Dorandeu et al. 2005). Des effets similaires sont retrouvés en utilisant l'isomère actif S(+) de la kétamine, à des doses diminuées d'un facteur 2 à 3, correspondant à la différence de puissance pharmacologique de cet isomère par rapport à la forme racémique. On constate cependant une perte d'efficacité au-delà d'une heure, comme pour les autres anti-NMDA étudiés pour lutter contre l'intoxication par le soman (Dorandeu et al. 2007).

Ces effets neuroprotecteurs sont très probablement liés aux différentes actions que la kétamine exerce sur la transmission glutamatergique :

1. antagonisme non compétitif des RNMDA (Figure n° 20) ;
2. comme cela a été démontré avec le MK-801 (Zhao et al. 2008), la kétamine pourrait influencer sur la plasticité synaptique des récepteurs NMDA en modifiant leur composition en différentes sous-unités, et en modifiant leur répartition synaptique ou extra-synaptique ;
3. enfin, la kétamine pourrait limiter la libération synaptique excessive de glutamate par son interaction avec les récepteurs pré-synaptiques nAChR $\alpha 7$ (Figure n° 20) (Hilmas et Williams 2007).

Cette combinaison d'effets d'inhibition/modification directe des RNMDA et d'effets indirects de l'inhibition de la libération de glutamate par l'inhibition des récepteurs pré-synaptiques nAChR $\alpha 7$, représente un ensemble de mécanismes qui permettent d'expliquer l'efficacité de la kétamine pour lutter contre les conséquences de l'excès de glutamate dans le SNC.

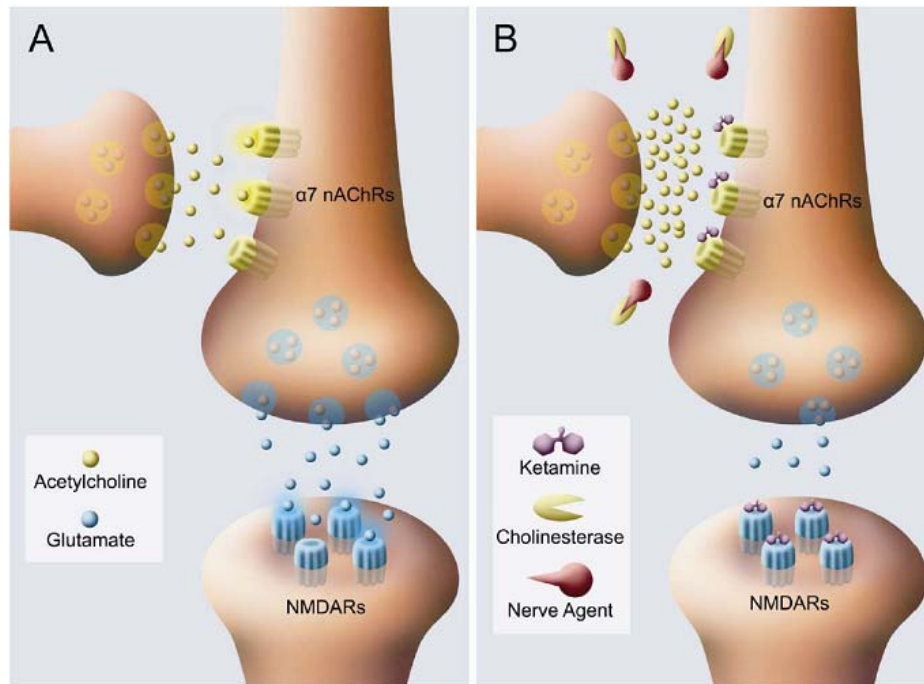


Figure n° 20 : Synapse hippocampique glutamatergique. Fonctionnement normal, inhibition de l'ACHé et mode d'action de la kétamine.

(A) Fonctionnement synaptique normal d'une synapse hippocampique. La libération d'ACh active les récepteurs nAChR $\alpha 7$ pré-synaptiques, ce qui induit une libération glutamate dans la fente synaptique de glutamate qui se fixe et active les RNMDA post-synaptiques. (B) Inhibition de l'ACHé par un NOP (Nerve agent) qui induit une surexcitation des nAChR $\alpha 7$, une augmentation du relargage de glutamate et une surstimulation des RNMDA. La figure montre deux mécanismes d'action de la kétamine par blocage des récepteurs nicotiques et glutamatergiques. L'action sur les nAChR $\alpha 7$ permet une limitation de la libération synaptique de glutamate. L'action sur les RNMDA permet une limitation de l'activation du système glutamatergique. Ces deux mécanismes permettent de stopper l'EME induit par les NOP. Illustration d'après Hilmas et Williams (2007).

II.2.2 Action anti-inflammatoire

II.2.2.1 Action anti-inflammatoire périphérique

La kétamine a montré des propriétés anti-inflammatoires systémiques dans de nombreuses études expérimentales. Administrée en perfusion continue à la dose de $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, elle permet notamment de limiter la mortalité et/ou la synthèse de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'induction d'un choc endotoxinique chez le rat (Taniguchi et al. 2003) ou le chien (DeClue et al. 2008).

II.2.2.2 Action anti-inflammatoire sur les cellules gliales

Sur un modèle *in vitro* de culture de cellules gliales de rat stimulées par le LPS, la kétamine réduit significativement et de façon dose-dépendante la synthèse du TNF α par les cellules microgliales, ainsi que la production de TNF α et de PGE $_2$ par les astrocytes (Shibakawa et al. 2005).

Le mécanisme d'inhibition de l'activation des cellules gliales par la kétamine reste mal connu. L'action sur les récepteurs NMDA est une voie d'action possible mais il convient de remarquer que l'utilisation d'autres anti-NMDA tels que l'acide D(-)-2-amino-5-phosphopentanoïque (D-AP5) n'exerce qu'une faible inhibition de la synthèse de TNF α dans des conditions similaires (Shibakawa et al. 2005). Par ailleurs, les récepteurs NMDA ne sont présents qu'en faible quantité à la surface des astrocytes et des cellules microgliales (Noda et al. 2000, Porter et al. 1997).

II.2.3 Autres propriétés intéressantes dans le cadre du traitement des intoxications par organophosphorés

II.2.3.1 Action bronchodilatatrice

Un effet bronchodilatateur a été mis en évidence chez l'homme, sur l'animal de laboratoire et sur des tissus isolés, sans que le mécanisme d'action spasmolytique de la kétamine soit complètement connu (Sinner et Graf 2008). De nombreux mécanismes d'action sont susceptibles d'être mis en jeu. L'action sur les récepteurs NMDA ne semble pas en cause dans ce phénomène. L'activité spasmolytique sur les muscles lisses passerait plutôt par une limitation de l'augmentation de la concentration en Ca $^{2+}$ extracellulaire. À dose sub-anesthésique, la kétamine potentialise aussi l'effet bronchodilatateur des catécholamines. Ces propriétés bronchodilatatrices sont particulièrement intéressantes dans le cas du

traitement de l'intoxication par le soman puisqu'un traitement par la kétamine est alors susceptible de contrecarrer les symptômes de bronchoconstriction liés à l'hypercholinergie.

II.2.3.2 Action sur la pression intracrânienne

L'induction d'une hypertension intracrânienne (HIC) a été observée lors d'administration intraveineuse de kétamine lorsque la PIC était déjà augmentée. Cette activité pourrait être un paramètre conduisant à écarter l'utilisation de la kétamine dans le traitement de l'intoxication par les organophosphorés. Cet effet indésirable ne semble cependant pas apparaître en l'absence d'HIC préexistante, et en maintenant la normocapnie par une ventilation contrôlée (Craven 2007, Himmelseher et Durieux 2005, Kohrs et Durieux 1998, Mayberg et al. 1995). Par ailleurs, une hyperventilation légère, ou l'administration simultanée de benzodiazépines, permettent d'éviter l'augmentation de PIC (Himmelseher et Durieux 2005). De façon avantageuse, la kétamine en association avec le propofol ou avec des barbituriques chez les patients traumatisés crâniens ou devant subir une craniotomie, a même tendance à faire diminuer la PIC (Himmelseher et Durieux 2005, Kohrs et Durieux 1998, Mayberg et al. 1995). L'effet potentiel de la kétamine sur ce paramètre doit donc être pris en considération dans le cadre du traitement éventuel d'une intoxication par les NOP.

Section B – Travaux expérimentaux

***Etude I – Physiopathologie de l'intoxication expérimentale
par le soman et réponse neuro-inflammatoire centrale***

I. Introduction et objectifs

Comme cela a été rappelé dans l'étude bibliographique, l'intoxication par le soman induit un EME partiel secondairement généralisé et accompagné de lésions irréversibles dans le cerveau.

De nombreuses atteintes du SNC sont accompagnées d'une réaction inflammatoire dans le tissu cérébral. Cette réponse inflammatoire a été particulièrement bien étudiée dans certaines affections telles que la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques, le traumatisme crânien, l'ischémie cérébrale, et plus récemment dans différents modèles d'EME.

L'existence d'une réaction inflammatoire dans le SNC après intoxication par les NOP a été démontrée par différentes études. Cependant, les connaissances actuelles restent parcellaires en raison de la diversité des paramètres étudiés et des modèles expérimentaux utilisés. Nous avons donc voulu préciser les caractéristiques de la réponse neuro-inflammatoire qui se développe à la suite d'un EME induit par un NOP en utilisant un modèle d'intoxication par une dose convulsivante de soman chez la souris.

Nos expérimentations ont pour but de :

- 1. Compléter les données existantes sur les suites d'une intoxication par le soman : effets cliniques et conséquences sur le développement de lésions cérébrales, au cours d'une période qui s'étend de 30 min à 7 j.**
- 2. Caractériser les modifications cellulaires du parenchyme cérébral en relation avec le développement d'une réponse inflammatoire.**
- 3. Évaluer l'induction de la production de certains médiateurs de l'inflammation dans le cerveau après l'intoxication.**

II. Protocoles d'études

Pour cette première étude, un total de 183 souris ont été intoxiquées par injection sous-cutanée d'une dose de 172 µg/kg de soman (200 µl ; s.c.), précédée de 5 min par l'administration intrapéritonéale d'une oxime réactivatrice des cholinestérases périphériques (HI-6 : 50 mg/kg ; 200 µl ; i.p.) (voir p. 262). Parmi les 154 animaux survivants, 150 ont pu être inclus dans les expérimentations et 4 ont dû être exclus pour des raisons expérimentales (3 mauvaises fixations de l'encéphale, 1 encéphale utilisé pour la mise au point des conditions de la RT-qPCR). Différents lots témoins ont été constitués, pour un total de 41 animaux.

II.1 Effets de l'intoxication sur notre modèle d'étude : effets généraux et lésions cérébrales

Afin de caractériser précisément les conséquences physiopathologiques de l'intoxication sur notre modèle d'étude, nous nous sommes intéressés, sur une durée de 7 j, aux conséquences de l'intoxication sur l'état clinique des animaux (déclenchement et durée des crises convulsives, évolution pondérale) et aux lésions cérébrales induites par l'EME. Les animaux ont été répartis au hasard dans différents lots, comme le précise la Figure n° 21, et ont été traités aux temps d'études indiqués. Deux lots témoins, prélevés 24 et 48 h après l'injection de sérum physiologique à la place du soman, ont été constitués (Figure n° 21).

Les données concernant le délai entre l'intoxication et le début des crises convulsives ainsi que la durée des convulsions n'ont pas été enregistrées pour les animaux utilisés pour l'étude de la cinétique des modifications du taux relatif d'ARNm. Pour les autres animaux intoxiqués (Étude I et Étude II), le délai d'initiation des convulsions a été de 4 min ± 10 sec (m ± ES ; n = 280) après l'intoxication.

Les animaux ont été observés continuellement pendant une période de 7 h, notamment pour s'assurer du déclenchement et de la persistance de crises convulsives pendant plusieurs heures. Pour tous les animaux ayant survécu au moins 6 h, les convulsions ont été observées pendant une durée généralement comprise entre 5 h et 5 h 30 min, avec une valeur médiane de 5 h 17 min (n = 81).

Le poids des animaux a été enregistré avant l'intoxication, puis à J1, J2, J3, J4 et J7 post-intoxication.

L'évolution de la gravité des lésions cellulaires dans différentes structures cérébrales a été chiffrée grâce à une technique semi-quantitative, par examen des lames colorées à l'hémalun & phloxine (H&P) (voir p. 283 et 287).

II.2 Étude de différents paramètres de la réponse neuro-inflammatoire

II.2.1 Réponse cellulaire

Afin d'étudier les modifications cellulaires de la réponse inflammatoire induites par l'intoxication, nous avons utilisé des coupes histologiques sériées.

La mise en évidence de l'activation microgliale a été réalisée par marquage histochimique à la lectine GSA-IB4 (voir p. 283). Les niveaux d'activation ont été déterminés pour chaque animal et pour chaque région étudiée en considérant les modifications morphologiques des cellules gliales (voir pp. 70 et 290).

L'évaluation de l'activation astrocytaire a été réalisée par estimation du pourcentage de surface exprimant la protéine GFAP après détection immunohistochimique (voir pp. 284 et 292).

La présence de granulocytes neutrophiles (GNN) a été mise en évidence par détection immunohistochimique, grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique de ces cellules (voir p. 284).

II.2.2 Réponse moléculaire

Nous avons quantifié l'ARNm d'un certain nombre de médiateurs de l'inflammation durant une période allant de 30 min à 7 j après l'intoxication. Les variations de taux d'ARNm ont été mesurées par RT-qPCR. Les résultats ont alors été normalisés par rapport à une combinaison de gènes de référence dont l'absence de variabilité a été vérifiée sur nos échantillons (voir p. 272). Les modifications recherchées concernent des médiateurs de l'inflammation présentés dans l'introduction bibliographique. Il s'agit de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α), de régulateurs de l'inflammation (SOCS3), de chimiokines (CXCL1, CCL5) et de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1). Nous nous sommes aussi intéressés à l'induction de l'ARNm d'enzymes impliquées tout au long de la voie des eicosanoïdes : phospholipases (cPLA2 α , sPLA2 IIE), cyclo-oxygénase (COX-2) et prostaglandines-synthases (mPGES-1, hPGDS).

Deux lots témoins ont été mis en place afin de s'assurer que les conditions de l'expérimentation ne perturbent pas l'induction des gènes de cytokines étudiées. Un des lots témoin a reçu uniquement du sérum physiologique (témoins NaCl), alors que l'autre a reçu une injection de HI-6 à la place du sérum physiologique (témoins HI-6). Ces témoins ont été réalisés aux temps 6 h et 24 h qui, d'après les données bibliographiques, sont les temps pour lesquels l'expression des ARNm recherchés est susceptible d'être maximale et donc le plus facilement détectable.

Afin de compléter les études des modifications des transcrits de la voie des eicosanoïdes, nous avons étudié, toujours sur une période s'étalant de 30 min à 7 j après l'intoxication, l'augmentation de l'expression des protéines associées (cPLA2 α , COX-2, hPGDS et m-PGES-1) par immunohistochimie (IHC). Nous avons utilisé des coupes sériées réalisées pour l'expérimentation visant à évaluer les dommages cellulaires et l'activation gliale.

Enfin, nous avons mesuré au cours du temps les variations d'activité « phospholipases A2 totales » (PLA2) et « cyclo-oxygénases totales » (COX), sans différencier les multiples phospholipases, ni les variations spécifiques de COX-1, COX-2 ou COX-3 (voir p. 278). Comme nous l'avons fait pour le dosage des ARNm, deux lots témoins (Témoins NaCl et Témoins HI-6) ont été mis en place.

n total / temps	7	20	7	12	29	19	41	22	14	20	191
To Injection Soman +	30 min	1 h	2 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	7 j	

Analyses histologiques (Tissus fixés)

Lots											
HI-6 - Soman (n=)	5		6	7	5*	7	6*	8	7*		51
Témoins HI-6 (n=)						6	3				9

Analyses effectuées

Histologie H&P

Domages et morts cellulaires / Oedème tissulaire

Histochimie -
Immunohistochimie

Activation / prolifération microgliale et astrocytaire
Expression de protéines spécifiques de la voie des eicosanoïdes
Infiltration de polynucléaires neutrophiles

RT-qPCR (Tissus congelés)

Lots											
HI-6 - Soman (n=)	7	7	7		7		7	7		7	49
Témoins HI-6 (n=)					5		5				10
Témoins NaCl (n=)					4		4				8

Analyses effectuées

Biologie moléculaire

Quantification ARNm
Cytokines, molécules d'adhésion, enzymes de la voie des eicosanoïdes

Activités enzymatiques (Broyats tissulaires)

Lots											
HI-6 - Soman (n=)	8		6	6*	6	6	6	6	6	6	50
Témoins HI-6 (n=)					4	3					7
Témoins NaCl (n=)					4	3					7

Analyses effectuées

Activité enzymatique

Mesure des activités COX et PLA2 totales

191

Figure n° 21 : Conception des études visant à explorer les modifications des paramètres de la réponse neuro-inflammatoire dans le cerveau de la souris après intoxication par le soman.

Dans les lots marqués (*), un total de 5 animaux non mentionnés dans les effectifs a été utilisé pour la mesure de la durée des crises convulsives. Ils ont été exclus des analyses ultérieures pour des raisons expérimentales (n = 3) ou suite à un décès à J1 (n = 1) ou à J3 (n = 1).

III. Résultats

III.1 Effets de l'intoxication

III.1.1 Effets généraux

Après intoxication par le soman, l'ensemble des animaux a présenté des signes classiques d'empoisonnement grave par les NOP et notamment des crises convulsives continues qui se sont développées pendant plusieurs heures. Après l'arrêt des convulsions, les animaux sont restés prostrés pendant une période d'environ 12 h, qui a été suivie d'une récupération lente. Sept jours après l'intoxication, ils présentaient toujours les signes d'un mauvais état général (faible mobilité, pelage terne, piqué). Sur l'ensemble des animaux intoxiqués dans cette première partie expérimentale ($n = 183$), 29 animaux sont décédés, soit un taux de mortalité de 15,8 %.

L'étude de l'évolution de la masse corporelle montre une forte perte de poids à 24 h et 48 h post-intoxication, suivie d'une récupération lente. Sept jours après l'intoxication, le poids n'était pas revenu au niveau initial (Figure n° 22).

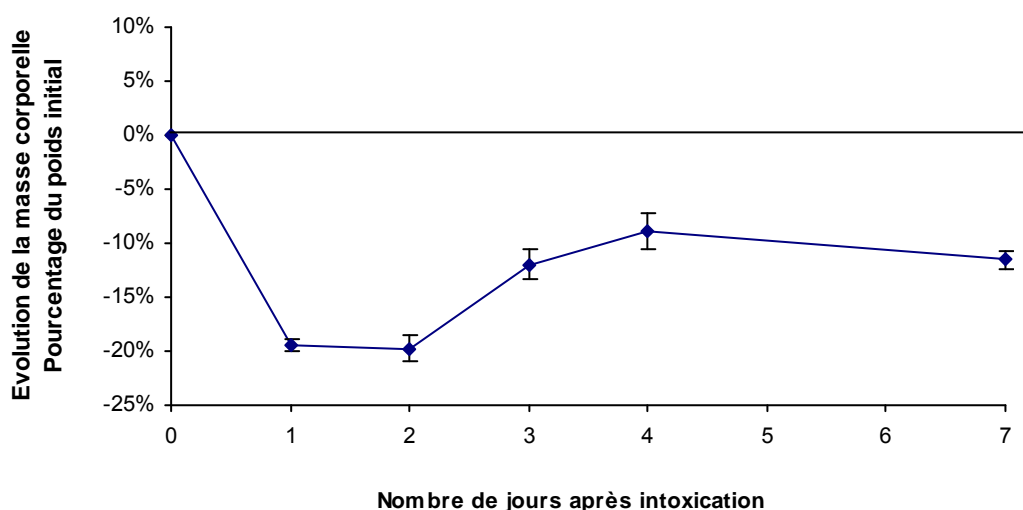


Figure n° 22 : Évolution de la perte de masse corporelle sur 7 jours après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.).

Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de perte de poids \pm ES par rapport à la masse initiale. Pour les temps d'études 1, 2, 3, 4 et 7 j, le nombre d'animaux est respectivement $n = 73, 49, 28, 7$ et 20.

III.1.2 Lésions cellulaires

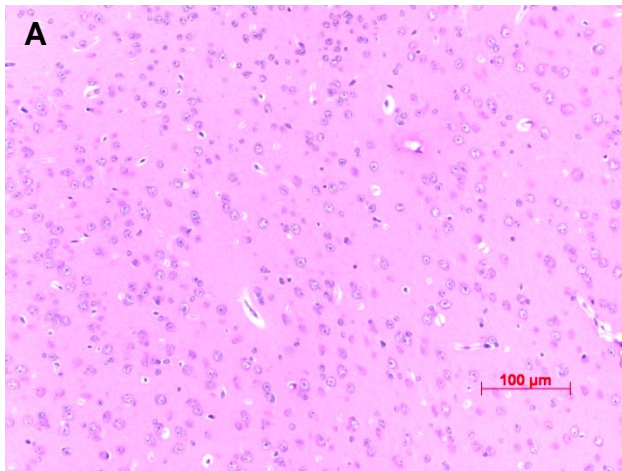
La quantification des lésions cellulaires après marquage H&P (Figure n° 23, Figure n° 24, Figure n° 25, Figure n° 26 et Tableau n° 3) a permis de mettre en évidence la survenue de dommages cellulaires chez l'ensemble des animaux de notre expérimentation. Ces derniers ont développé des crises convulsives continues et de longue durée (crises jusqu'au moment du sacrifice ou d'une durée supérieure à 3 h).

Dès la 1^{ère} heure suivant l'intoxication, un faible nombre de cellules éosinophiles (< 10 % du total des cellules de la région considérée) est visible dans le cortex piriforme et la zone subgranulaire du GD (Figure n° 25-B). Quelques animaux (2/5) montrent la même proportion de cellules éosinophiles dans le septum latéral. La proportion de cellules en souffrance est beaucoup plus importante (> 25 % du total des cellules) dans l'amygdale (Figure n° 23-B). La présence de cellules éosinophiles est accompagnée dès la première heure de signes d'œdème tissulaire dans l'amygdale et dans la zone subgranulaire du GD (Figure n° 25-B).

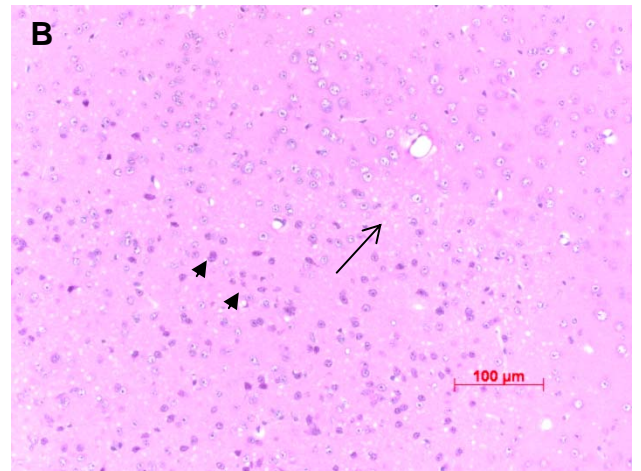
À partir de la 3^{ème} heure, des cellules éosinophiles sont visibles dans les aires CA1 et CA3, dans le thalamus dorsal, le striatum, et les zones d'œdème tissulaire sont plus étendues.

De la 6^{ème} à la 72^{ème} heure, on constate une tendance à l'aggravation des lésions et une généralisation de l'œdème tissulaire. Dans le GD, seules quelques cellules éosinophiles (< 10 % du total des cellules) accompagnées d'un œdème sont visibles jusqu'à 48 h dans la couche polymorphe et la zone subgranulaire du GD (Figure n° 25-C).

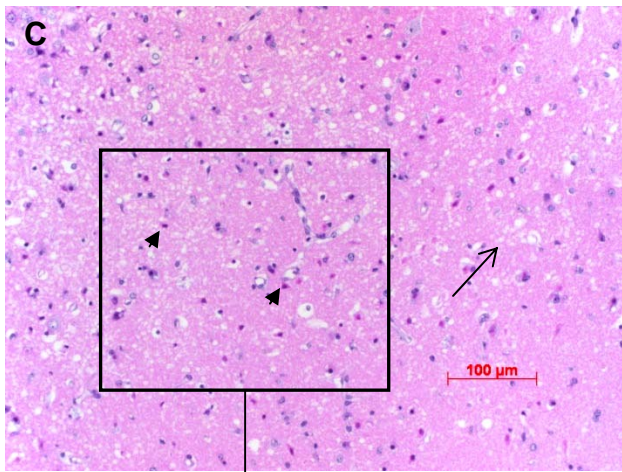
Les animaux sacrifiés le 7^{ème} jour montrent une proportion de cellules éosinophiles moins importante que lors de la période 6-72 h. Dans les structures les plus fortement lésées, des plages de pertes cellulaires (diminution de la densité de cellules saines) sont visibles à partir de 72 h et en augmentation à 7 j.



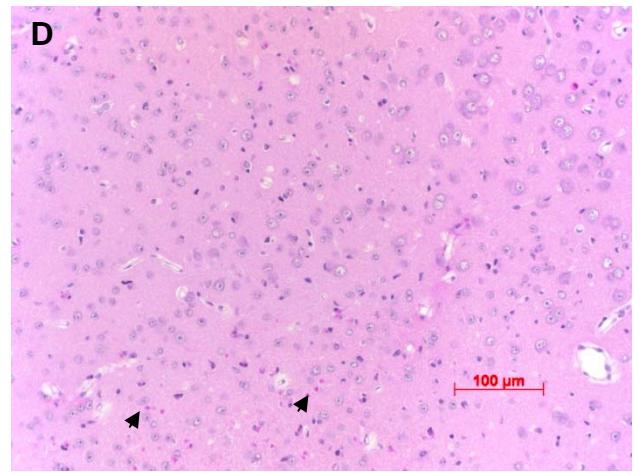
A
Témoins



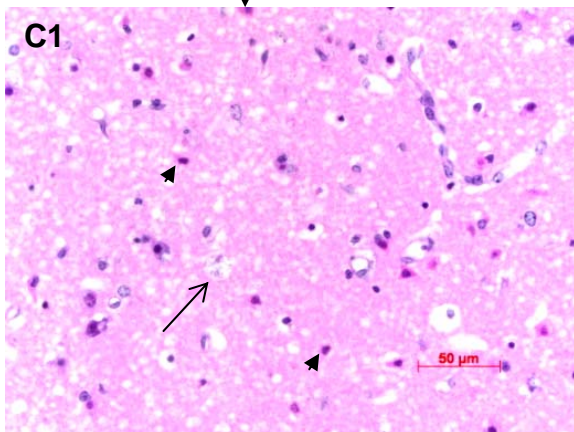
B
Soman + 1 h



C
Soman + 48 h



D
Soman + 7 j

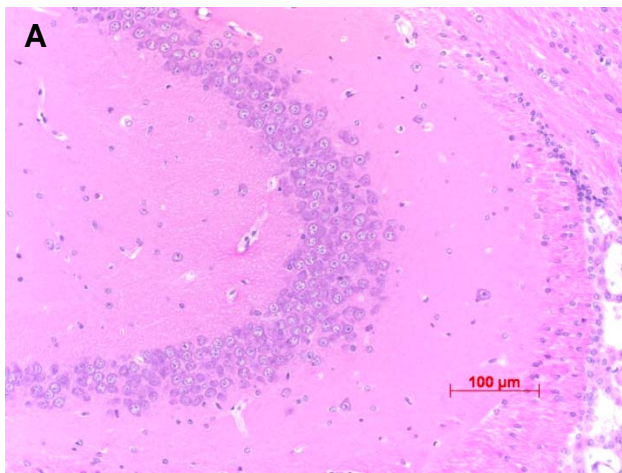


C1

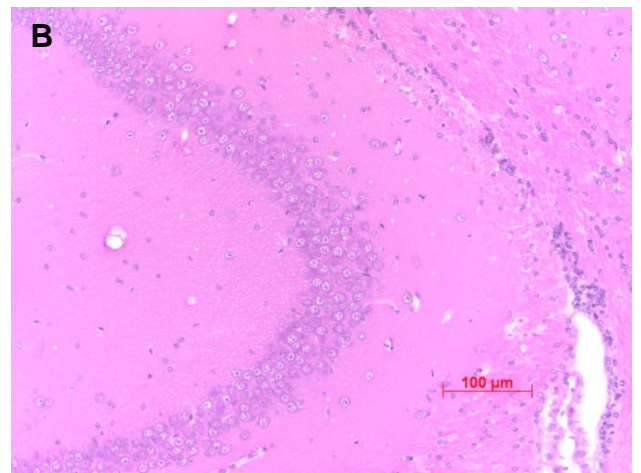
Amygdale

Figure n ° 23 : Étude des événements neurodégénératifs par marquage H&P dans l'amygdale de la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μg/kg ; s.c.).

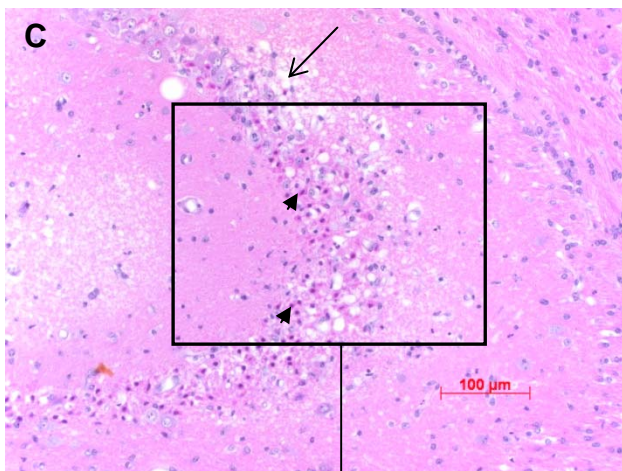
Les planches présentent l'amygdale d'animaux témoins (A) et d'animaux sacrifiés 1 h (B), 48 h (C et C1)) et 7 j (D) après intoxication. On distingue des cellules éosinophiles (►) et de l'œdème (→) dès la 1^{ère} heure. Barre d'échelle = 100 μm (A, B, C et D) ou 50 μm (C1).



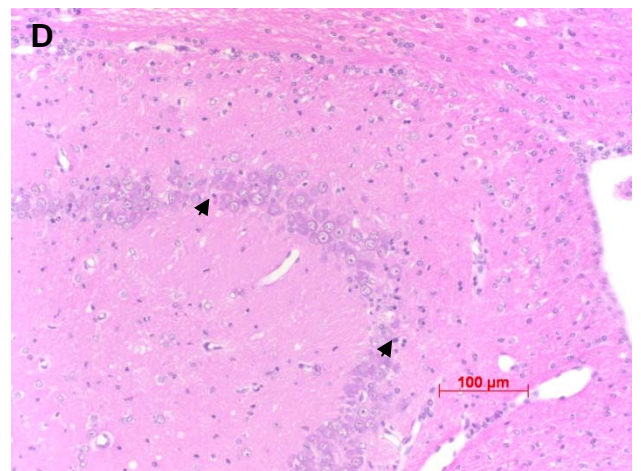
A
Témoins



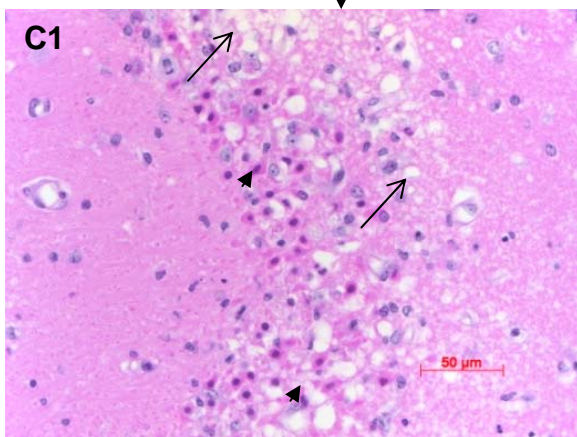
B
Soman + 1 h



C
Soman + 48 h



D
Soman + 7 j

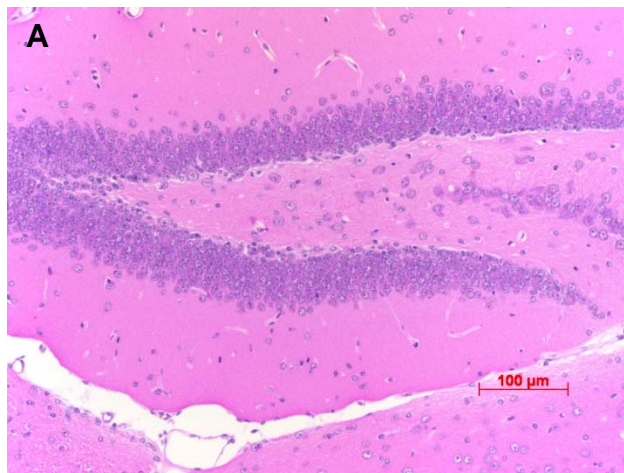


C1

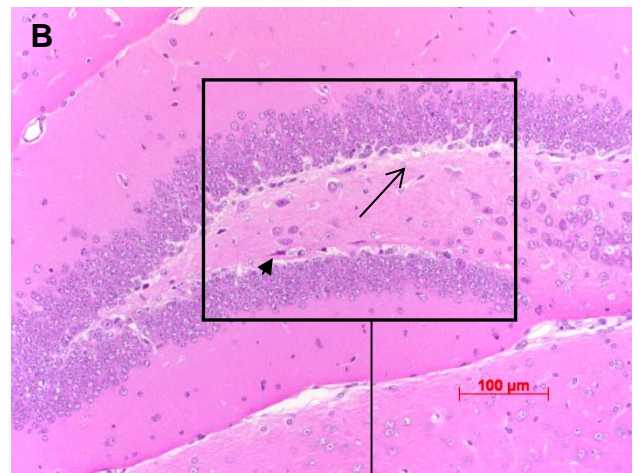
CA3

Figure n° 24 : Étude des événements neurodégénératifs par marquage H&P dans la région CA3 de la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μg/kg ; s.c.).

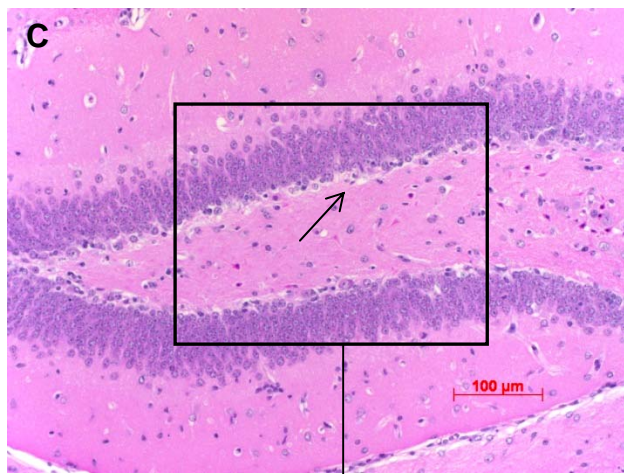
Les planches présentent la région CA3 d'animaux témoins (A) et d'animaux sacrifiés 1 h (B), 48 h (C et C1) et 7 j (D) après intoxication. Barre d'échelle = 100 μm (A, B, C et D) ou 50 μm (C1). On distingue des cellules éosinophiles (▴) et de l'œdème (→). Barre d'échelle = 100 μm (A, B, C et D) ou 50 μm (C1).



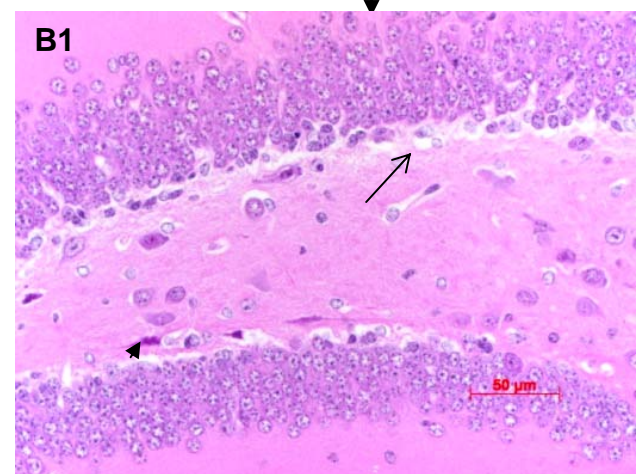
Témoins



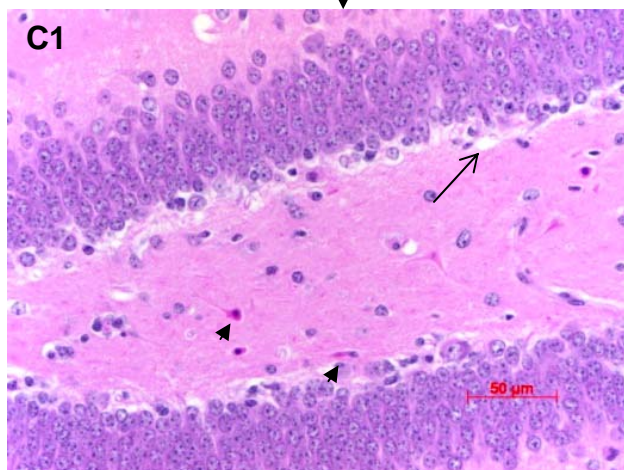
Soman + 1 h



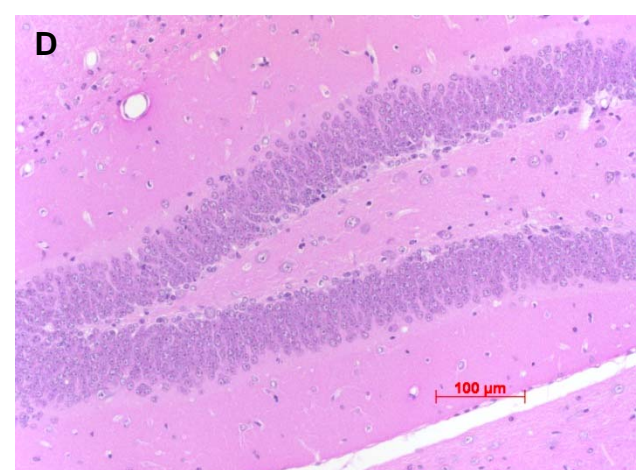
Soman + 48 h



B1



C1



Soman + 7 j

GD

Figure n° 25 : Étude des événements neurodégénératifs par marquage H&P dans le GD de la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μg/kg ; s.c.). Les planches présentent le gyrus denté d'animaux témoins (A) et d'animaux sacrifiés 1 h (B et B1), 48 h (C et C1) et 7 j (D) après intoxication. On distingue des cellules éosinophiles (▶) et de l'œdème (→) dès la 1^{ère} heure. Barre d'échelle = 100 μm (A, B, C et D) ou 50 μm (B1 et C1).

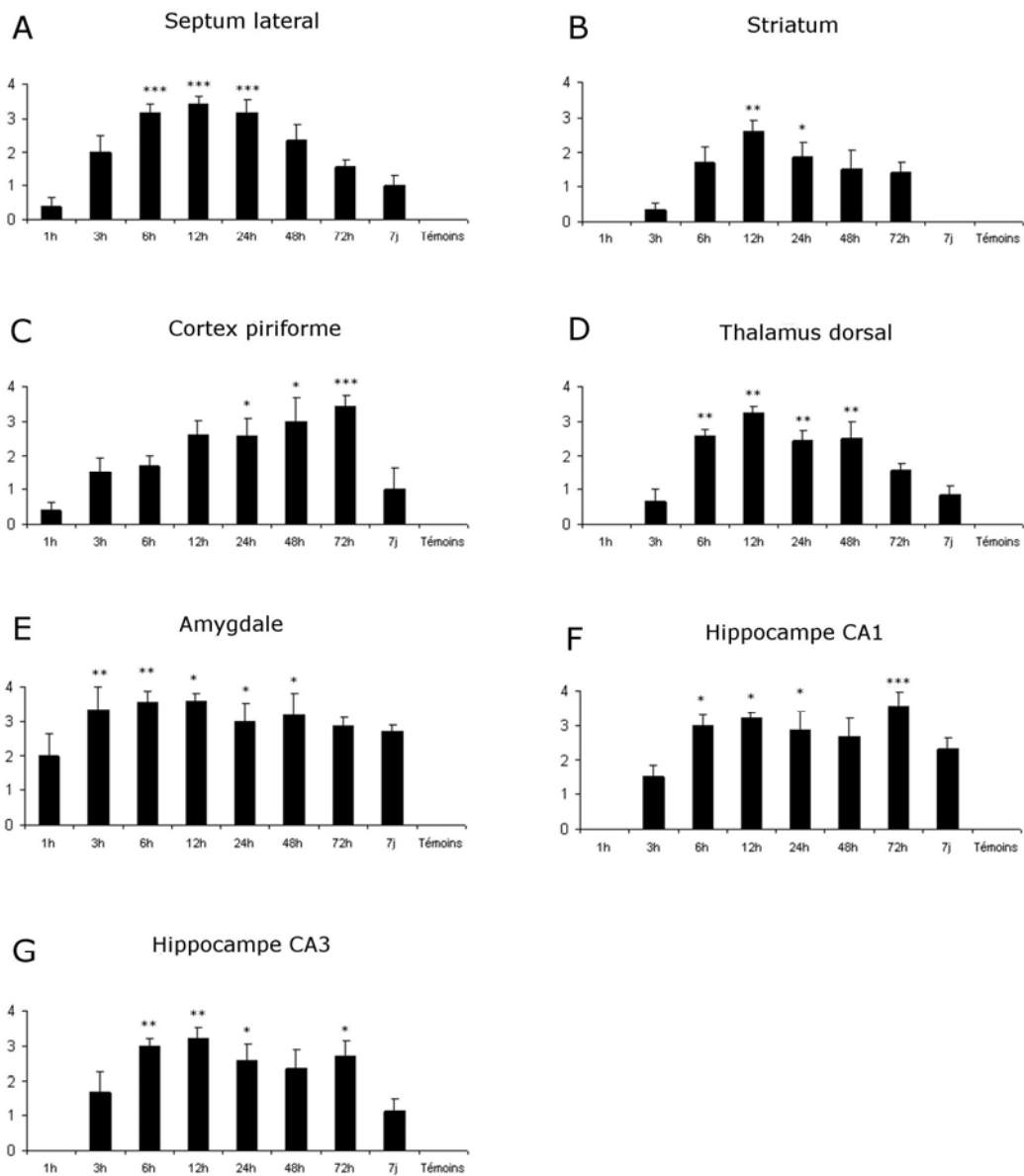


Figure n° 26 : Score des lésions cellulaires chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.).

Les résultats sont exprimés en moyenne ± ES du score de lésions relevé chez l'ensemble des animaux, en prenant en considération la proportion de cellules éosinophiles pour chaque région étudiée. Les comparaisons ont été réalisées pour chaque lot (n = 5-8), par rapport au lot témoin (n = 9). (A) Septum latéral, (B) Striatum, (C) Cortex piriforme, (D) Thalamus dorsal, (E) Amygdale, (F) Hippocampe CA1, (G) Hippocampe CA3. (*), $\alpha < 0,05$; (**), $\alpha < 0,01$; (***), $\alpha < 0,001$.

III.2 Réponse neuro-inflammatoire cellulaire

III.2.1 Activation microgliale

Chez les animaux témoins, les cellules microgliales GSA-positives apparaissent faiblement marquées, de forme ovale avec de nombreuses et fines ramifications. Ces cellules quiescentes sont distribuées de façon homogène dans l'ensemble du cerveau (exemple : Figure n° 27-A).

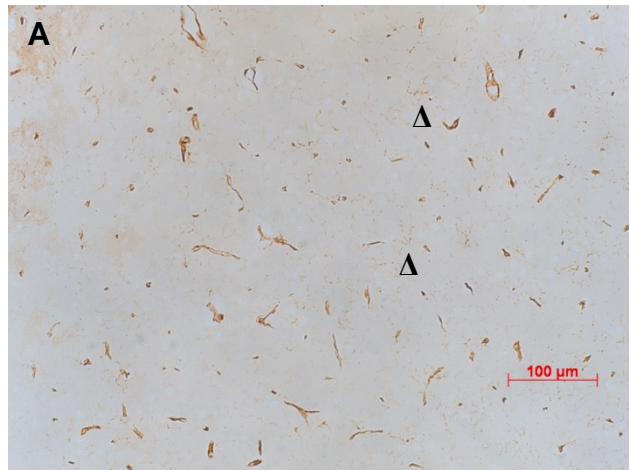
Chez les animaux intoxiqués, aucune modification du marquage par la GSA-IB4 n'est détectée aux temps 1 h, 3 h et 6 h après l'exposition au soman.

Aux temps 12 h et 24 h, différents stades d'activation microgliale sont observés dans l'ensemble des structures étudiées (Tableau n° 3, Figure n° 9) :

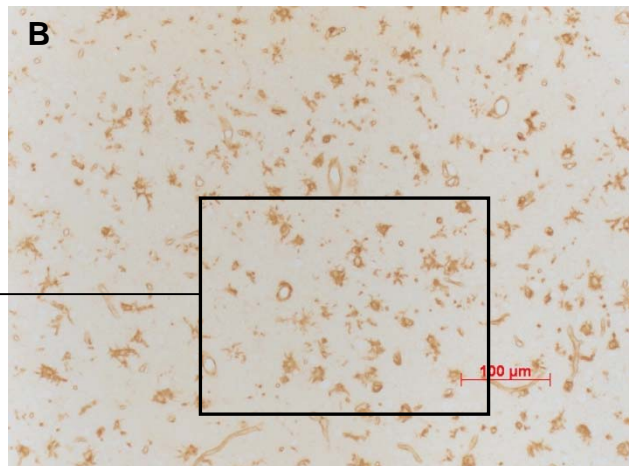
- cellules microgliales hyper-ramifiées (stade intermédiaire) : augmentation de la longueur et de l'épaisseur de leurs ramifications.
- cellules microgliales activées : augmentation de la taille du corps cellulaire qui apparaît plus intensément marqué.

Dans ces mêmes régions, on constate une accentuation graduelle du niveau d'activation à 48 h, puis à 72 h (Figure n° 27-B et B1). Au stade d'activation maximale, les cellules activées présentent une forme amiboïde (activité phagocytaire), ainsi qu'une forte augmentation de taille de leur corps cellulaire et une disparition des ramifications.

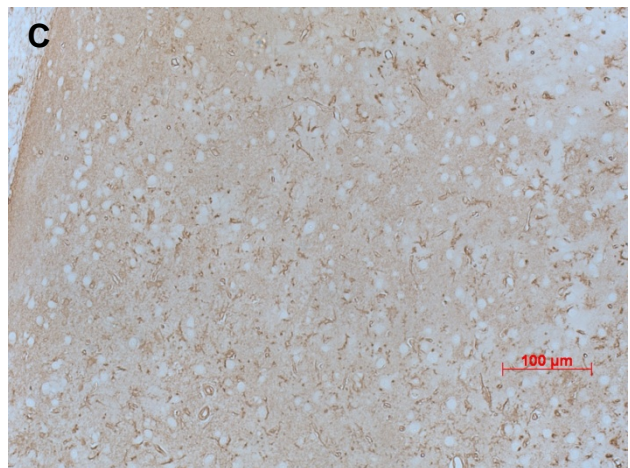
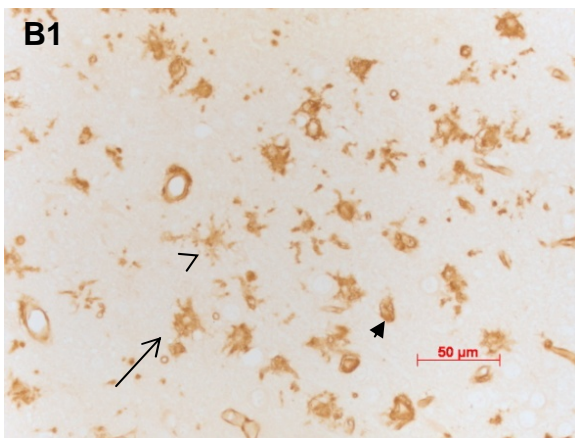
À 7 j, le marquage de la microglie est toujours visible, mais nettement plus diffus, ne permettant pas de discerner correctement la morphologie cellulaire (exemple : amygdale Figure n° 27-C).



Témoins



Soman + 72 h



Soman + 7 j

Amygdale

Figure n° 27 : Étude de l'activation des cellules microgliales par marquage histochimique par la lectine GSA-IB4 chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μg/kg ; s.c.).

Les planches présentent l'amygdale d'animaux témoins (A) et d'animaux sacrifiés 72 h (B et B1) et 7 j (C) après intoxication. Sur les photos A et B1, on distingue des cellules quiescentes (Δ), une cellule hyper-ramifiée (>), des cellules activées (→) et amiboïdes (▶). Barre d'échelle = 100 μm (A, B et C) ou 50 μm (B1).

III.2.2 Activation astrocytaire

Chez les animaux témoins, une expression constitutive basale de GFAP est détectée dans certaines structures cérébrales telles que le corps calleux, la capsule externe, la capsule interne, le septum latéral (Figure n° 28-A1), le GD et les zones CA1, CA3 de l'hippocampe (Figure n° 28-B1). Ces astrocytes non réactifs présentent une forme étoilée, aux multiples ramifications.

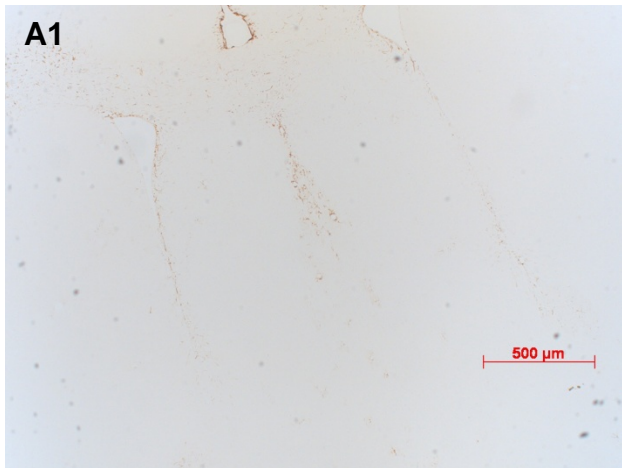
Chez les animaux intoxiqués, il n'est pas noté d'augmentation du marquage de GFAP aux temps 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, et 24 h après l'exposition au soman.

À 48 h, une faible augmentation du marquage de GFAP (augmentation de la taille et du nombre des astrocytes) est détectée dans le striatum, le cortex piriforme, l'amygdale, le thalamus dorsal, la zone CA3 et dans la couche pyramidale de CA1 (Tableau n° 3 et Figure n° 28-B2). Par comparaison, le marquage apparaît plus intense dans le septum latéral (Tableau n° 3 et Figure n° 28-A2) et la couche moléculaire du GD.

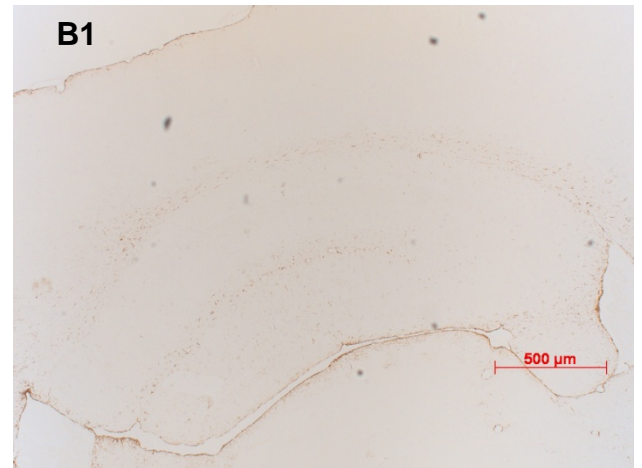
À 72 h, le marquage de GFAP s'étend dans la couche granulaire (Tableau n° 3) et dans la couche polymorphe du GD et est visible dans le *stratum oriens*, le *stratum radiatum*, le *stratum lacunosum-moleculare* de la zone CA1.

Aux temps d'études 48 h et 72 h, le marquage GFAP est totalement absent dans certaines portions du cortex piriforme, de l'amygdale et de la zone CA3 (Figure n° 28-B2).

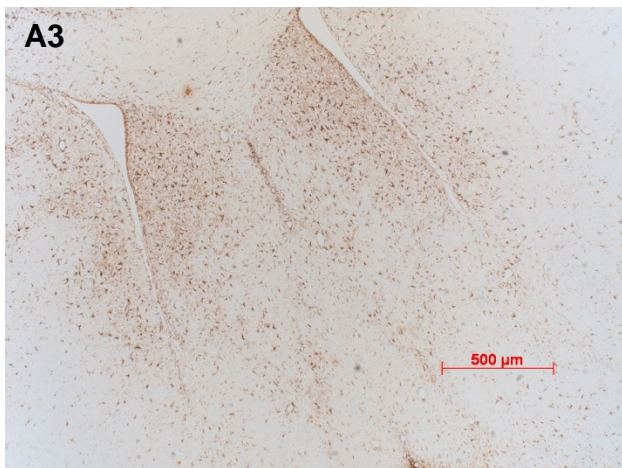
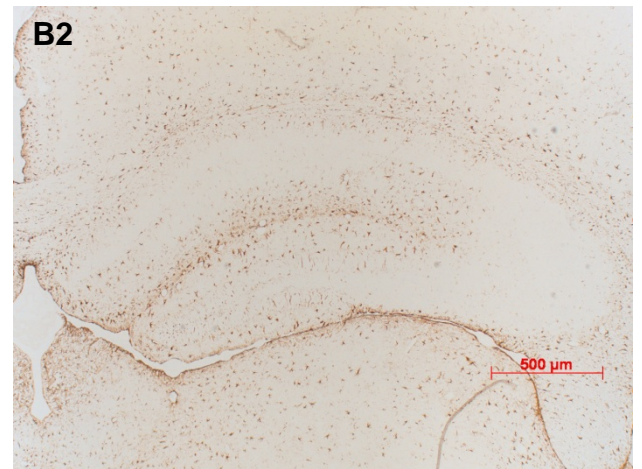
L'expression de GFAP est maximale à 7 j dans l'ensemble des structures étudiées et en particulier dans les zones qui apparaissent totalement dépourvues de marquage à 48 h et 72h (Figure n° 28-A3 et Figure n° 28-B3).



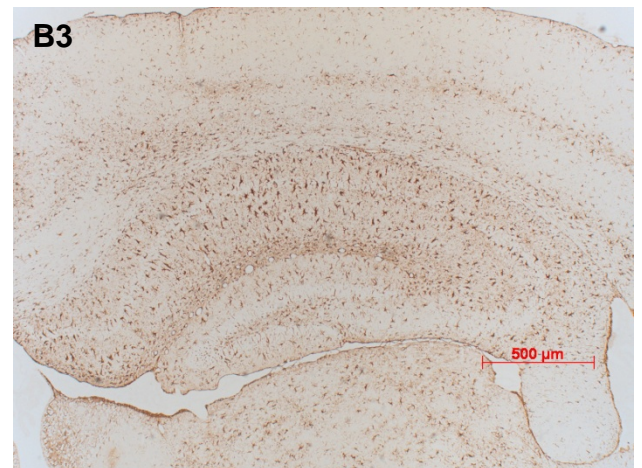
Témoins



Soman + 48 h



Soman + 7 j



Septum

Hippocampe

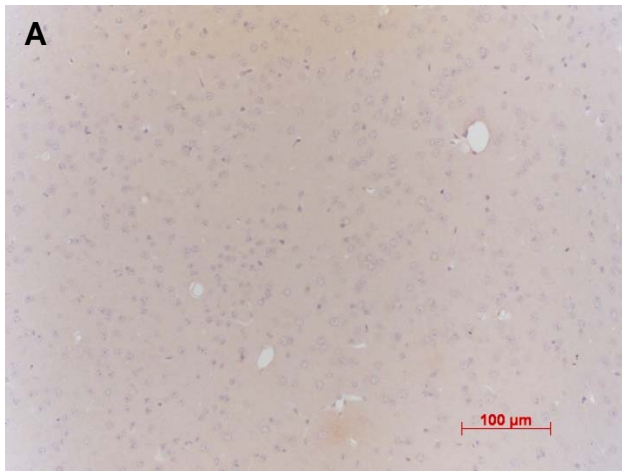
Figure n° 28 : Étude de l'activation des cellules astrocytaires par marquage immunohistochimique de la protéine GFAP dans le septum et l'hippocampe de souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μg/kg ; s.c.).

Les planches présentent le septum et l'hippocampe d'animaux témoins (A1 et B1) et d'animaux sacrifiés 48 h (A2 et B2) et 7 j (A3 et B3) après intoxication. Barre d'échelle = 500 μm.

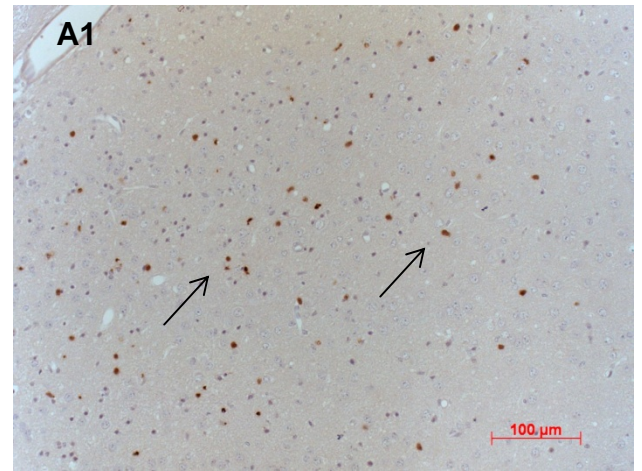
III.2.3 Présence de granulocytes neutrophiles dans le parenchyme cérébral

L'infiltration du parenchyme par les GNN a été mise en évidence à proximité immédiate et au sein des zones lésées, aux temps 12 h, 24 h, 48 h, et 72 h. L'infiltration est détectée chez une fraction des animaux aux différents temps d'études, comme décrit dans le Tableau n° 3. Des GNN sont visibles dès 12 h dans l'amygdale (Figure n° 29-A1), puis dans le thalamus dorsal à 24 h et enfin dans le cortex piriforme et la région CA3 de l'hippocampe à 72 h (Figure n° 29-B1).

L'amygdale est la structure dans laquelle la présence de GNN est visible pendant la période la plus longue, de 12 h à 72 h (Tableau n° 3).

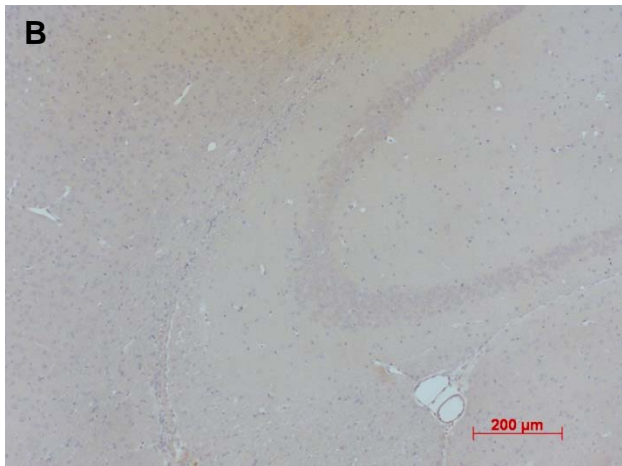


Témoins

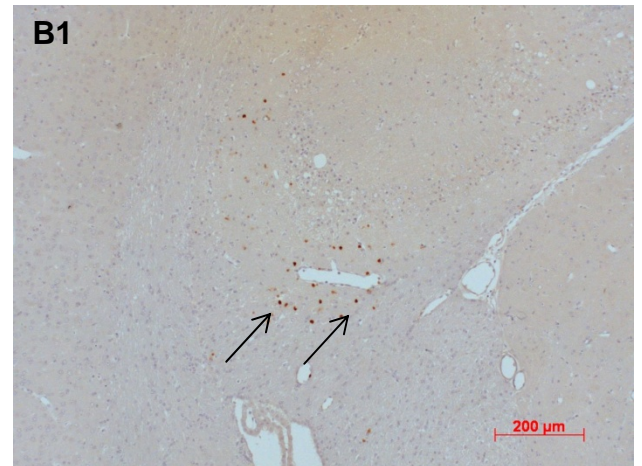


Soman + 24 h

Amygdale



Témoins



Soman + 72 h

CA3

Figure n° 29 : Étude immunohistochimique de l'infiltration du parenchyme cérébral par les polynucléaires neutrophiles (→) dans l'amygdale et dans la région CA3 chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.).

Les figures représentent des souris témoins (A et B) et intoxiquées, respectivement 24 h (A1) et 72 h (B1) après prétraitement HI-6 et intoxication par le soman. Barre d'échelle = 100 µm (A et A1) ou 200 µm (B et B1).

Structures	Marquage / coloration	To Soman +								
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	7 j	
Septum latéral	H&P	+ (2/5)	++	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	++ (oed) (pc)	++ (pc)
	GSA				+	+	++	+++	ND	
	GFAP						++	++	+++	
	GNN									
Striatum	H&P		+	++ (oed)	+++ (oed)	++ (oed)	++ (oed)	++ (oed)		
	GSA				+	+	++	+++	ND	
	GFAP						+	+	++	
	GNN									
Cortex piriforme	H&P	+ (2/5)	++	++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed) (pc)	++ (pc)	
	GSA				+	+	++	+++	ND	
	GFAP						+	+	+++	
	GNN							+ (3/8)		
Thalamus dorsal	H&P		+	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	++ (oed) (pc)	+	
	GSA				+	+	++	+++	ND	
	GFAP						+	+	++	
	GNN					+ (4/7)				
Amygdale	H&P	++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed) (pc)	+++ (pc)	
	GSA				+	+	+++	+++	ND	
	GFAP						+	+	+++	
	GNN				+ (3/5)	+ (4/7)	+ (3/6)	+ (3/8)		
Hippocampe – CA1 (couche pyramidale)	H&P		++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed) (pc)	+++ (pc)	
	GSA				+	+	++	+++	ND	
	GFAP						+	++	+++	
	GNN									
Hippocampe – CA3 (couche pyramidale)	H&P		++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed)	+++ (oed) (pc)	++ (pc)	
	GSA				+	+	+++	+++	ND	
	GFAP						+	+	++	
	GNN							+ (4/8)		
Gyrus denté (couche granulaire)	H&P									
	GSA				+	+	++	++	ND	
	GFAP							+	+	
	GNN									
Gyrus denté (couche subgranulaire)	H&P	+	+	+	+	+	+	(oed)		
	GSA				+	+	++	++	ND	
	GFAP							+	+	
	GNN									

Tableau n° 3 : Évolution sur 7 jours de la réponse cellulaire centrale après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.).

Lésions cellulaires (H&P) : score lésionnel moyen (L) : (+) = 0 < L < 1 ; (++) = 1 ≤ L < 2 ; (+++) = L ≥ 2.

Activation microgliale (GSA) : score d'activation moyen (m) : (+) = 0 < m < 1 ; (++) = 1 ≤ m < 2,5 ; (+++) = 2,5 ≤ m.

Activation astrocytaire (GFAP) : % de surface exprimant GFAP (+) = 1 % < a < 5 % ; (++) = 5 % ≤ a < 10 % ; (+++) = 10 % ≤ a.

GNN : (+) = présence de GNN (nombre d'animaux positif / nombre total d'animaux).

oed : œdème ; pc : pertes cellulaires ; ND : non déterminé.

III.3 Réponse neuro-inflammatoire moléculaire

III.3.1 Etude des modifications de la concentration cérébrale de l'ARNm de médiateurs de l'inflammation et d'enzymes de la voie des eicosanoïdes

Aux temps d'études 6 h et 24 h, quel que soit le marqueur considéré, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de concentration d'ARNm entre les lots témoins NaCl et témoins HI-6. Les conditions de réalisation de l'expérimentation, en particulier l'utilisation de HI-6, n'influent donc pas sur la quantité des ARNm recherchés. Les quatre lots témoins ont finalement été réunis en un seul et même lot témoin (n = 18).

Après intoxication par le soman, une augmentation importante et significative de l'ARNm des marqueurs étudiés a été mise en évidence dans le cortex et l'hippocampe (Figure n° 30, Figure n° 31, Figure n° 32, Tableau n° 4, Tableau n° 5 et Tableau n° 6).

- Modifications du taux relatif de l'ARNm de cytokines pro-inflammatoires et de modulateurs de l'inflammation (Figure n° 30, Tableau n° 4).

La tendance générale constatée est la suivante :

- Dans le cortex, l'augmentation des ARNm est plus précoce que dans l'hippocampe; son expression est maximale aux temps 12 h - 24 h et le niveau d'ARNm est généralement normalisé au 7^{ème} j.
- Dans l'hippocampe, le pic d'expression maximal est mesuré aux temps 24 h - 48 h; le retour au niveau de base n'est généralement pas atteint le 7^e j.
- Dans le cervelet, où seuls les ARNm des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α et IL-6), de SOCS3 et d'ICAM-1 ont été recherchés, les modifications de concentration d'ARNm sont beaucoup moins importantes que dans les deux autres structures. Des augmentations significatives

d'ARNm ne sont détectées que pour trois marqueurs (IL-1 β , SOCS3, ICAM-1). En général, les augmentations sont précoces (30 min - 1 h) avec un pic se situant vers 2 h. Les taux retrouvent leur niveau de base 7 j après l'intoxication. Compte tenu de la faiblesse des modifications de la concentration en ARNm dans cette structure, ces dernières n'ont pas été mentionnées dans la Figure n° 30, ni dans la Figure n° 31.

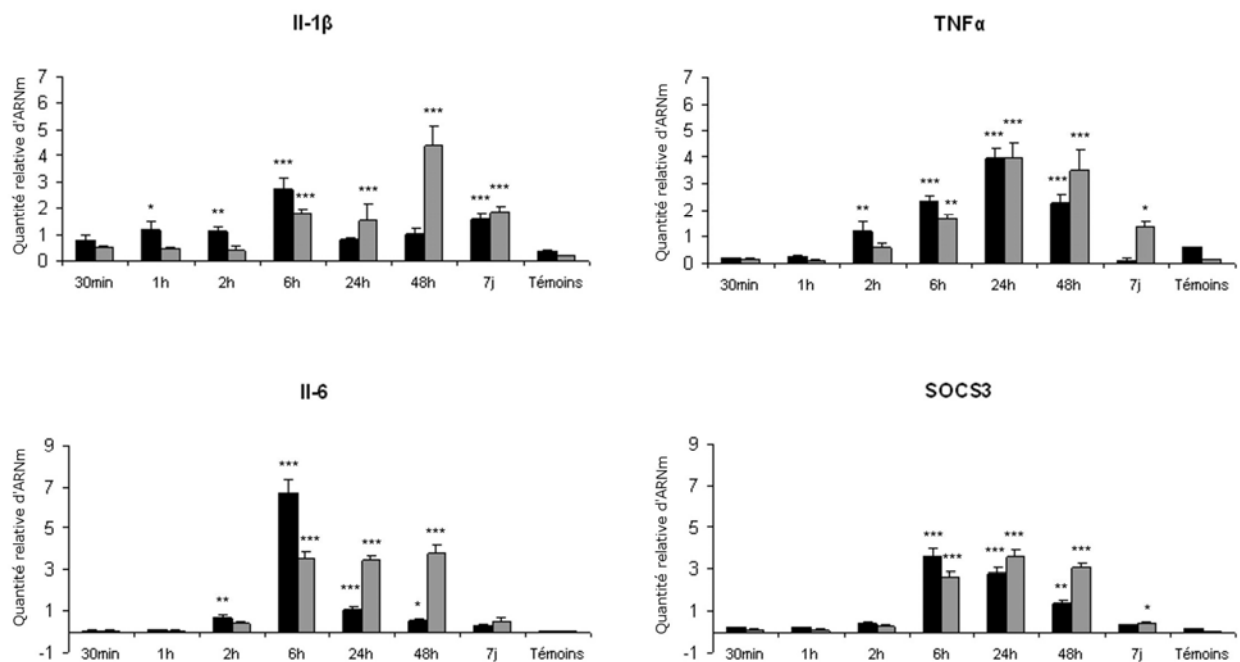


Figure n° 30 : Variations sur 7 j du taux relatif d'ARNm de IL-1 β , TNF α , IL-6 et SOCS3 dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.).

Pour chaque temps d'étude, le résultat (moyenne \pm ES) représente le taux d'ARNm du gène cible rapporté au taux d'ARNm d'une combinaison de gènes de référence. Les comparaisons ont été réalisées pour chaque lot (n = 5-7), par rapport au lot témoin (n = 18). (*), $\alpha < 0,05$; (**), $\alpha < 0,01$; (***), $\alpha < 0,001$.

To Soman +	Cervelet				Cortex				Hippocampe			
	IL-1 β	TNF α	IL-6	SOCS3	IL1 β	TNF α	IL-6	SOCS3	IL1 β	TNF α	IL-6	SOCS3
30 min												
1 h												
2 h						14	16				16	
6 h						26	151	20		12	123	54
24 h						45	25	16		29	121	72
48 h						26	12		24	26	134	62
7 j											17	

Tableau n° 4 : Augmentation moyenne par rapport au lot témoin de la concentration d'ARNm déterminée par RT-qPCR de cytokines pro-inflammatoires et de modulateurs de l'inflammation.

Gris clair : augmentation ≤ 2 ; Gris moyen : $2 < \text{augmentation} \leq 5$; Noir : $5 < \text{augmentation} \leq 10$

- Modifications du taux relatif de l'ARNm de chimiokines et de molécules d'adhésion (Figure n° 31, Tableau n° 5).

Les modifications des taux relatifs d'ARNm des chimiokines et des molécules d'adhésion présentent des profils globalement plus hétérogènes que pour les cytokines pro-inflammatoires.

Les modifications de taux relatif de l'ARNm de CXCL1 sont assez proches de la tendance générale décrite pour les cytokines pro-inflammatoires. L'augmentation des taux observés dans les deux structures est très rapide, significative dès 30 min. La normalisation apparaît plus tardivement dans l'hippocampe ; l'augmentation est toujours significative à 48 h.

L'augmentation des taux relatifs de CCL5 suit un profil très différent, ne devenant significative dans les deux structures étudiées que 24 h après l'intoxication. Le taux d'ARNm se maintient à un niveau élevé 7 j après l'intoxication.

Dans le cortex et dans l'hippocampe, le taux relatif d'ARNm de ICAM-1 est augmenté dès 6 h après l'intoxication. Cette augmentation persiste jusqu'à 7 j.

L'augmentation du taux relatif de l'ARNm de VCAM-1 est peu importante. Elle n'est détectée que dans l'hippocampe à 48 h et 7 j.

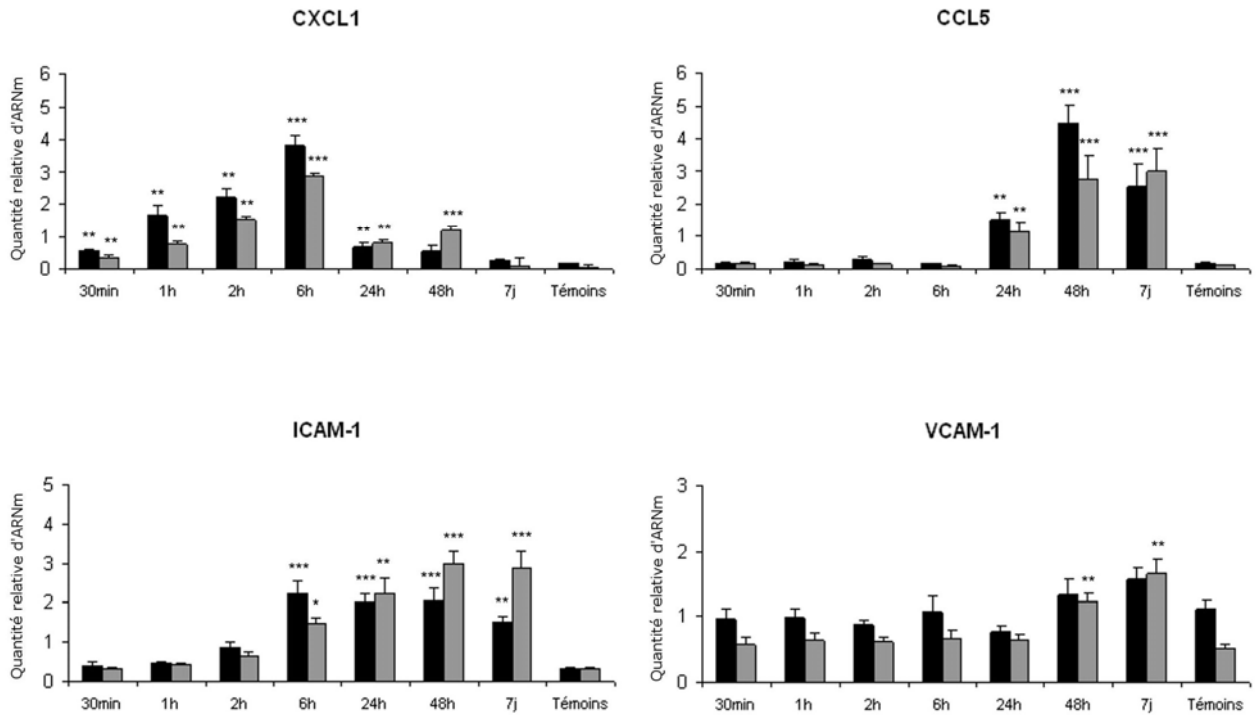


Figure n° 31 : Variations sur 7 j du taux relatif d'ARNm de CXCL1, CCL5, ICAM-1 et VCAM-1 dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.).

Pour chaque temps d'étude, le résultat (moyenne ± ES) représente le taux d'ARNm du gène cible rapporté au taux d'ARNm d'une combinaison de gènes de référence. Les comparaisons ont été réalisées pour chaque lot (n = 5-7), par rapport au lot témoin (n = 18). (*), $\alpha < 0,05$; (**), $\alpha < 0,01$; (***), $\alpha < 0,001$.

To Soman +	Cortex				Hippocampe			
	CXCL1	CCL 5	ICAM-1	VCAM-1	CXCL1	CCL 5	ICAM-1	VCAM-1
30 min								
1 h	11				12			
2 h	14				25			
6 h	25				46			
24 h					13			
48 h		27			19	23		
7 j		15				25		

Tableau n° 5 : Augmentation moyenne par rapport au lot témoin de la concentration d'ARNm déterminée par RT-qPCR de chimiokines et de molécules d'adhésion.

Gris clair : augmentation ≤ 2 ; Gris moyen : $2 < \text{augmentation} \leq 5$; Noir : $5 < \text{augmentation} \leq 10$

- Modifications du taux relatif de l'ARNm d'enzymes de la voie des eicosanoïdes (Figure n° 32, Tableau n° 6).

Les modifications du taux relatif des ARNm de sPLA2 IIE, cPLA2 α , COX-2 et hPGDS suivent un profil comparable à la tendance générale décrite pour les cytokines pro-inflammatoires, avec une augmentation plus précoce dans le cortex que dans l'hippocampe. Comme pour les cytokines pro-inflammatoires, cette augmentation se maintient à un niveau plus élevé dans l'hippocampe aux temps d'études 48 h ou 7 j. On constate une augmentation du taux relatif de l'ARNm de COX-2 dans le cortex 30 min après intoxication. Les taux d'ARNm retrouvent leur niveau de base 48 h après intoxication dans cette même structure.

Les modifications du taux relatif de l'ARNm de la m-PGES1 présentent une amplitude nettement plus réduite que celle des autres marqueurs étudiés. Une faible augmentation ne dépassant jamais 3 fois le taux de base est détectée de 2 h à 7 j, uniquement dans l'hippocampe. Aucune augmentation significative n'a été mise en évidence dans le cortex.

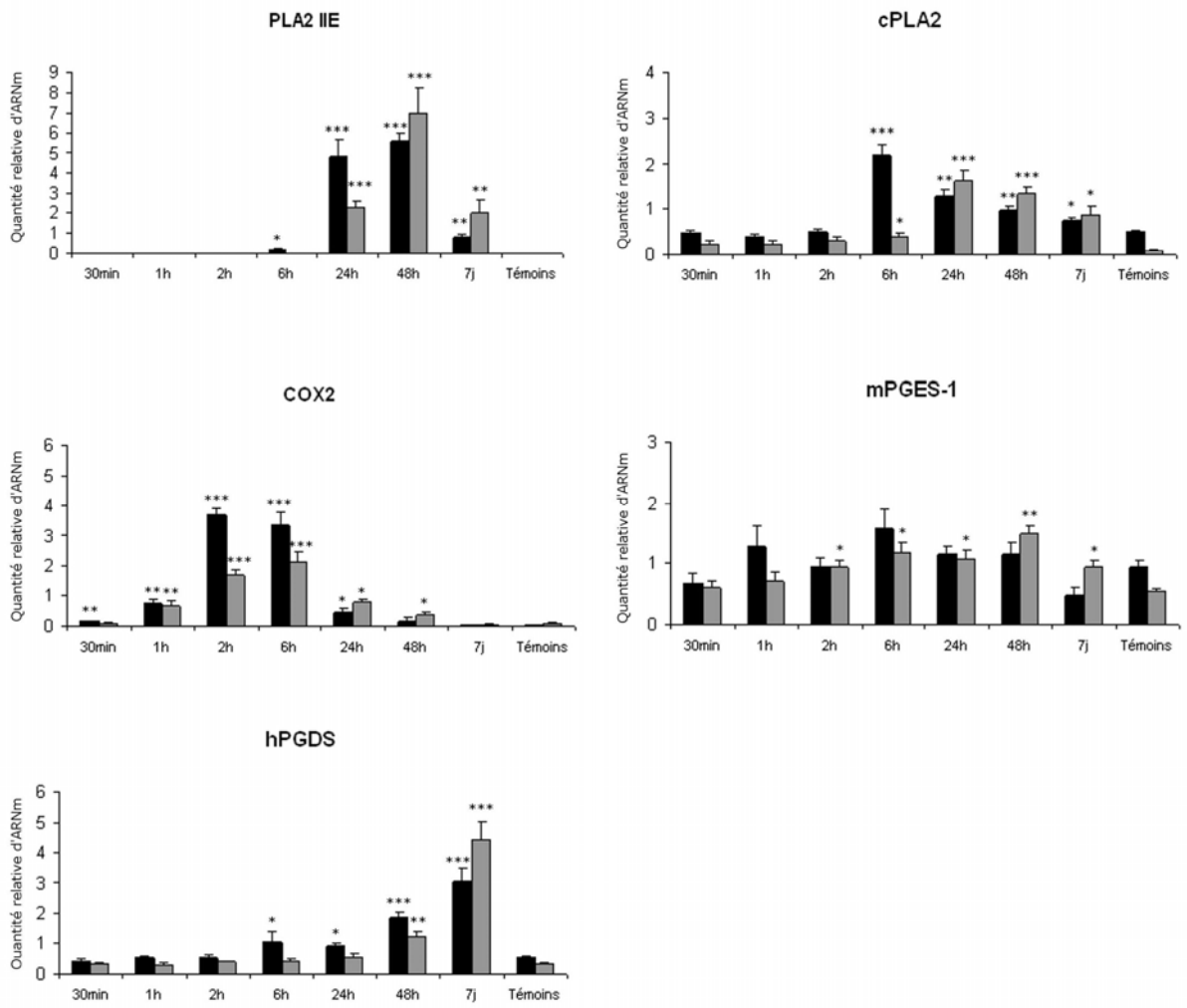


Figure n° 32 : Variations sur 7 jours du taux relatif d'ARNm d'enzymes de la voie des eicosanoïdes dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.).
 Pour chaque temps d'étude, le résultat (moyenne ± ES) représente le taux d'ARNm du gène cible rapporté au taux d'ARNm d'une combinaison de gènes de référence. Les comparaisons ont été réalisées pour chaque lot (n = 5-7), par rapport au lot témoin (n = 18). (*), $\alpha < 0,05$; (**), $\alpha < 0,01$; (***) , $\alpha < 0,001$.

To + Soman	Cortex					Hippocampe				
	PLA2 2E	cPLA2 α	COX-2	mPGES	hPGDS	PLA2 2E	cPLA2 α	COX-2	mPGES	hPGDS
30 min										
1 h			20							
2 h			97					16		
6 h			87					20		
24 h	120		12			25	18			
48 h	140					109	15			
7 j	20					53	10			13

Tableau n° 6 : Augmentation moyenne par rapport au lot témoin de la concentration d'ARNm déterminée par RT-qPCR d'enzymes de la voie des eicosanoïdes.
 Gris clair : augmentation ≤ 2 ; Gris moyen : $2 < \text{augmentation} \leq 5$; Noir : $5 < \text{augmentation} \leq 10$

III.3.2 Étude des modifications de la synthèse cérébrale des enzymes de la voie des eicosanoïdes par immunohistochimie

III.3.2.1 Phospholipase A2 cytosolique α (cPLA2 α)

Chez les animaux témoins, seules quelques cellules du cortex apparaissent faiblement marquées. Les autres zones du cerveau ne présentent pas de marquage visible (exemples du septum et de l'hippocampe : Figure n° 33-A1 et B1).

Chez les animaux intoxiqués, il n'apparaît pas de changement dans l'ensemble des zones observées à 1 h, 3 h, 6 h, 12 h et 24 h post-intoxication. Les premières modifications ne sont détectées qu'à 48 h ; un léger marquage est alors visible principalement dans le septum latéral (en périphérie des ventricules latéraux), l'amygdale, le cortex piriforme et la zone subgranulaire du GD. Les cellules pyramidales de l'hippocampe ne présentent pas de marquage à ce stade.

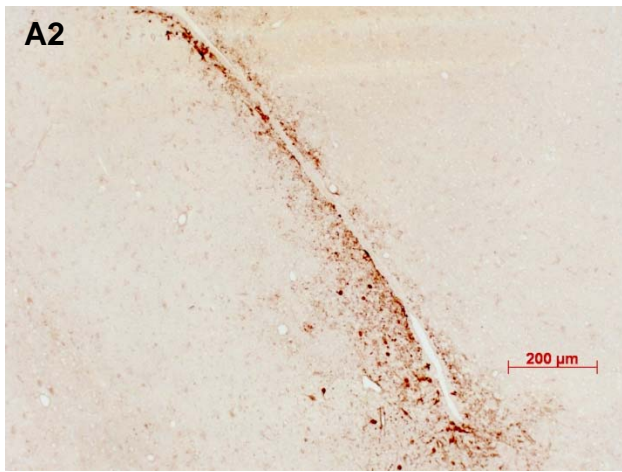
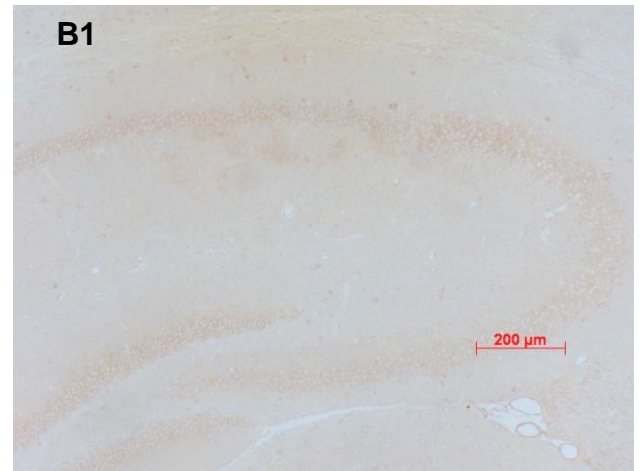
À 72 h, on détecte essentiellement une accentuation de l'immunoréactivité dans le septum latéral (Figure n° 33-A2) et une apparition du marquage dans la couche pyramidale de CA1 et CA3 (Figure n° 33-B2). Pour ce temps d'étude, on remarque que les parois des vaisseaux sanguins sont marquées dans la zone du *stratum radiatum* de CA1 (Figure n° 33-B2).

L'observation réalisée 7 j après l'intoxication montre une extension de l'immunoréactivité dans le septum latéral (Figure n° 33-A3), le *stratum radiatum* et le *stratum oriens* de CA1 et CA3, ainsi que dans la zone supragranulaire du GD (Figure n° 33-B3).

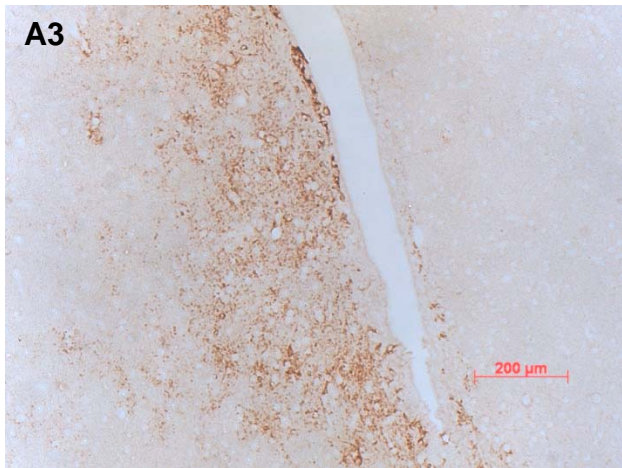
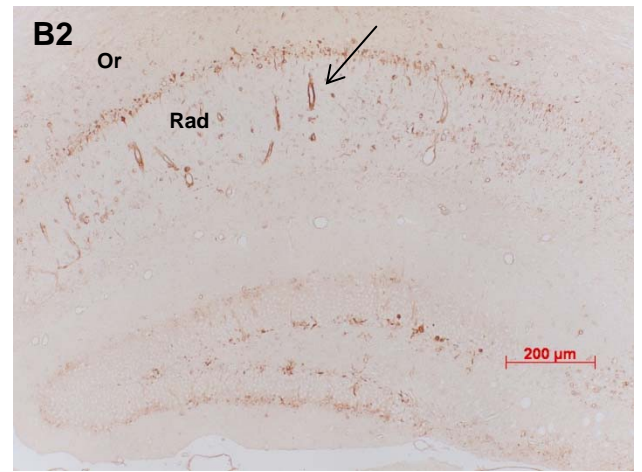
Le marquage demeure absent dans le thalamus et le striatum, pour tous les temps d'étude.



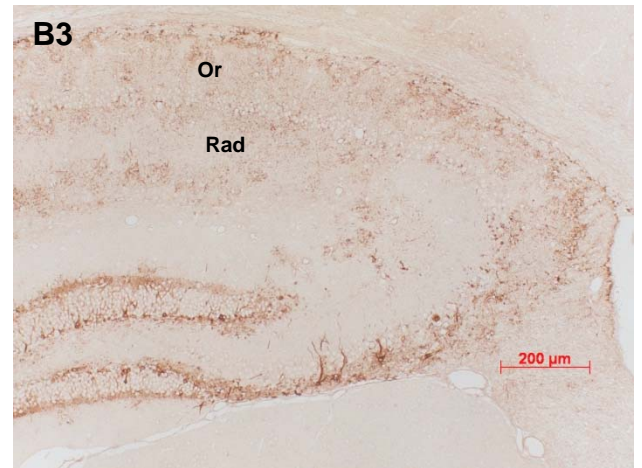
Témoins



Soman + 72 h



Soman + 7 j



Septum

Hippocampe

Figure n° 33 : Marquage immunohistochimique de la protéine cPLA2 α chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.).

Les planches présentent le septum latéral et la région CA3 d'animaux témoins (A1 et B1) et d'animaux sacrifiés 72 h (A2 et B2) et 7 j (A3 et B3) après intoxication. Dans l'aire CA1, à 72 h, on distingue un marquage de cPLA2 α au niveau des vaisseaux sanguins (\rightarrow) du *stratum radiatum* (Rad). Or = *stratum oriens*. Barre d'échelle = 200 μ m.

III.3.2.2 Cyclo-oxygénase 2

Chez les animaux témoins, on constate une faible immunoréactivité basale qui se détache du bruit de fond, détectée dans 25 à 50 % des cellules pyramidales de l'hippocampe (Figure n° 34-A), du cortex piriforme et de l'amygdale. Le marquage observé est cytoplasmique et de faible intensité. On n'observe pas de marquage dans les autres structures cérébrales.

Chez les animaux intoxiqués, deux types de marquage ont été observés dans les structures étudiées. Aux temps 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h et 48 h, le marquage mis en évidence est cytoplasmique (Figure n° 34-B1). Aux temps 72 h et 7 j, on distingue chez certains animaux un autre type de marquage, non cytoplasmique, d'aspect punctiforme (Figure n° 34-C1). L'augmentation d'expression de COX-2 concerne généralement les régions cérébrales des animaux chez lesquels des lésions cellulaires importantes ont été mises en évidence par la coloration H&P.

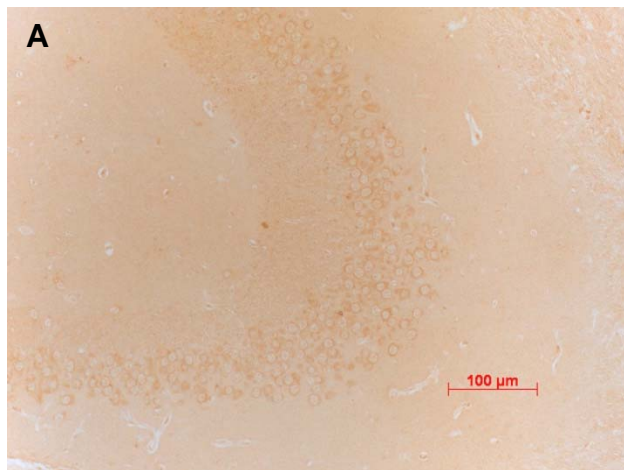
Parmi les différentes structures étudiées, le striatum et le septum n'ont pas montré de modifications notables de l'immunoréactivité.

Dans le thalamus dorsal, un marquage de faible intensité est visible aux temps 3 h, 6 h et 12 h.

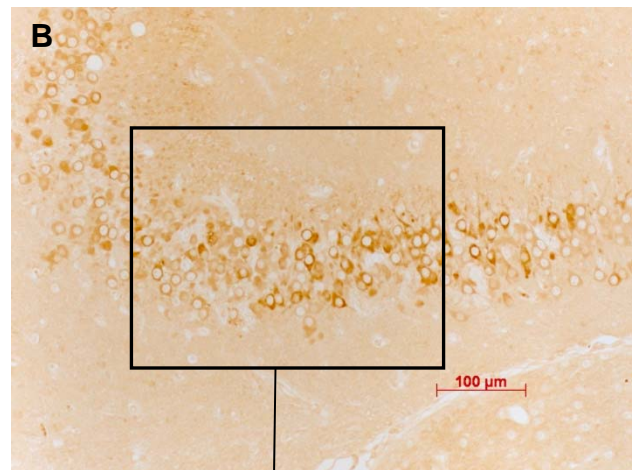
Dans le cortex piriforme et l'amygdale, on constate une faible augmentation du marquage à partir de 3 h, devenant maximale à 24 h et 48 h. L'intensité du marquage de ces deux régions décroît à partir de 72 h et devient minimale à 7 j. Chez les animaux présentant les lésions les plus importantes, un marquage punctiforme est visible dans le cortex piriforme et l'amygdale à partir de 72 h, et reste visible à 7 j.

Dans l'hippocampe, on observe une discrète augmentation de l'immunoréactivité dès 3 h dans la zone CA3, puis dans CA1 à partir de 6 h. Le marquage s'intensifie pour atteindre un niveau maximum aux temps 24 h - 48 h (Figure n° 34-B et B1). À partir de 48 h, le niveau

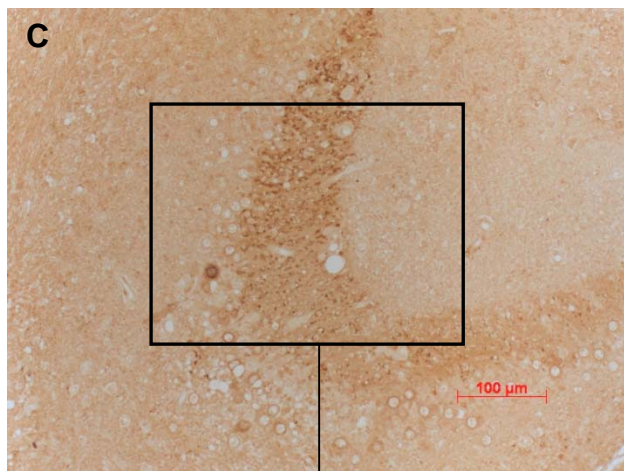
d'expression de COX-2 dans les structures hippocampiques présente une forte hétérogénéité chez les différents animaux du même lot. À 72 h, le marquage prend un aspect punctiforme dans la couche pyramidale de CA1 et CA3 (Figure n° 34-C) chez les animaux ayant montré des lésions importantes de l'hippocampe. À 7 j, le marquage punctiforme persiste dans la zone CA3 de l'hippocampe chez les animaux fortement atteints (Figure n° 34-D). Dans le GD, seul un petit nombre de cellules de la couche granulaire (1 à 5 %) présente un marquage cytoplasmique visible à 6 h. Un marquage intense et punctiforme apparaît à 72 h et 7 j.



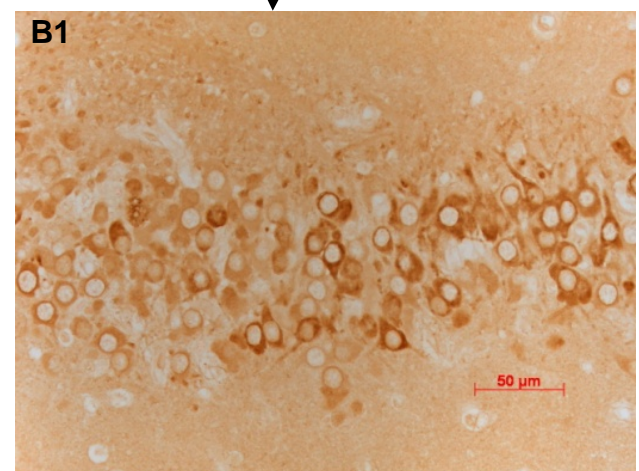
A
Témoins



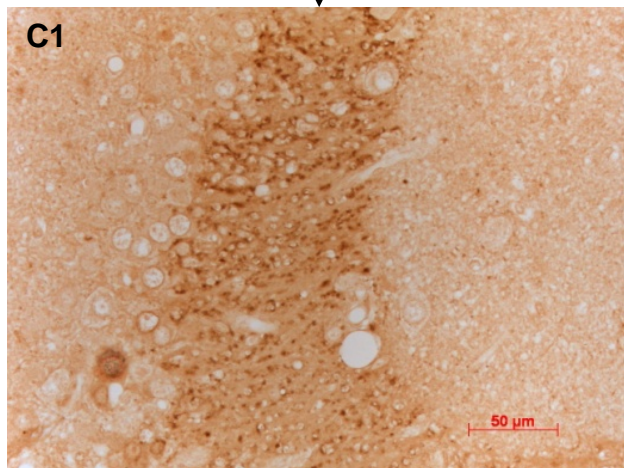
B
Soman + 48 h



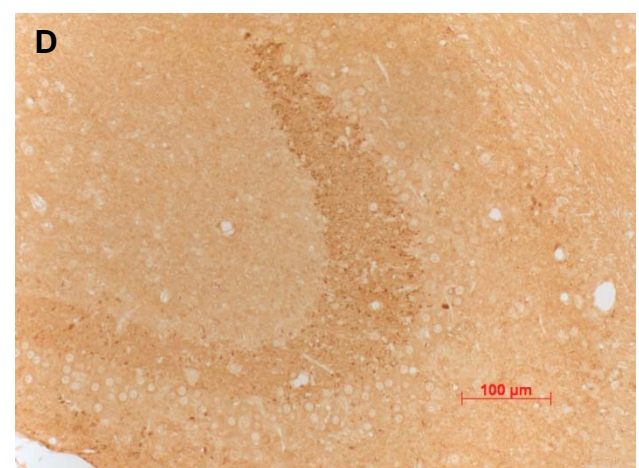
C
Soman + 72 h



B1



C1



D
Soman + 7 j

CA3

Figure n ° 34 : Marquage immunohistochimique de la protéine COX-2 chez la souris après pré-traitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.). Les planches présentent la région CA3 d'animaux témoins (A) et d'animaux sacrifiés 48 h (B et B1), 72 h (C1 et C2) et 7 j (D) après intoxication. Barre d'échelle = 100 µm (A, B, C et D) ou 50 µm (B1 et C1).

III.3.2.3 Prostaglandine D-synthase hématopoïétique (hPGDS)

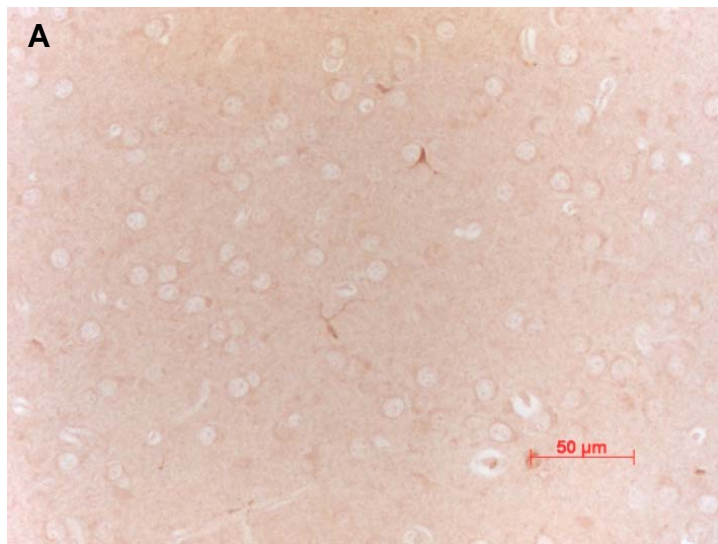
Chez les animaux témoins, les cellules immunoréactives ont un cytoplasme de petite taille, de forme ovale, comportant de nombreuses et fines ramifications (Figure n° 35-A). Ces cellules sont réparties de façon homogène dans l'ensemble du cerveau.

Chez les animaux intoxiqués, il n'a pas été mis en évidence d'augmentation de l'immunomarquage aux temps inférieurs à 24 h après l'intoxication.

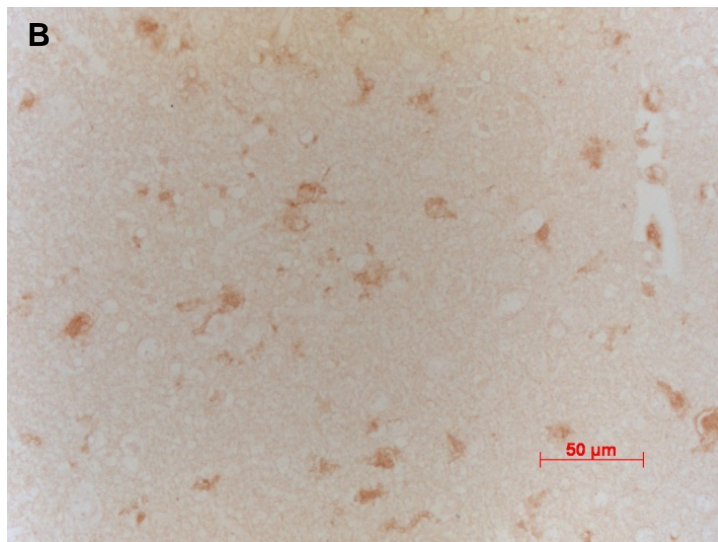
À 24 h, une augmentation du nombre et de la taille des cellules marquées a été constatée dans le cortex piriforme, le septum latéral, le striatum, le thalamus dorsal, l'amygdale, les zones CA1 et CA3, ainsi que dans le GD. Les cellules marquées présentent un cytoplasme de taille augmentée par rapport aux animaux témoins, ainsi que des ramifications plus longues et plus épaisses.

À 48 h et 72 h, on distingue une accentuation de l'intensité du marquage dans les structures mentionnées précédemment. Les cellules marquées ont alors une forme plus arrondie, le volume du cytoplasme est augmenté, et la taille des ramifications diminue (Figure n° 35-B) (amygdale).

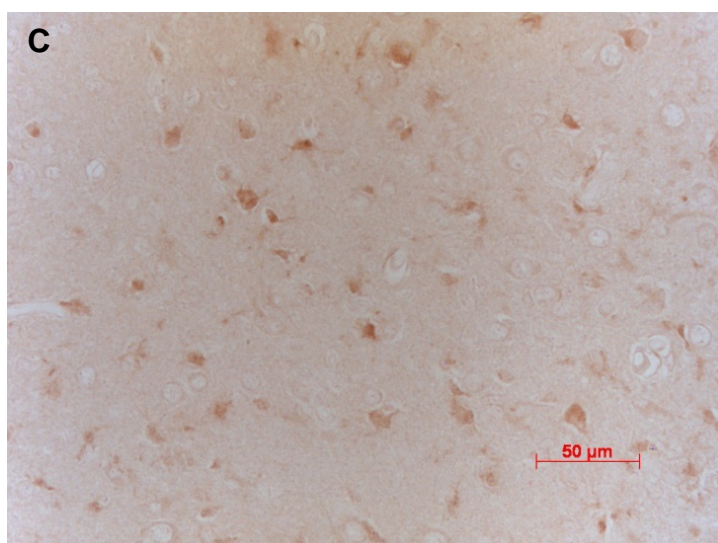
À 7 j, on distingue des cellules fortement marquées, de forme arrondie, seulement dans le cortex piriforme, le septum latéral, l'amygdale (Figure n° 35-C), le thalamus dorsal ainsi que dans les zones CA1 et CA3 de l'hippocampe. Ces zones correspondent aux aires cérébrales les plus fortement lésées après l'intoxication par le soman. Dans les autres zones du cerveau, on retrouve un faible immunomarquage de cellules ramifiées, comparable au marquage des animaux témoins.



Témoins



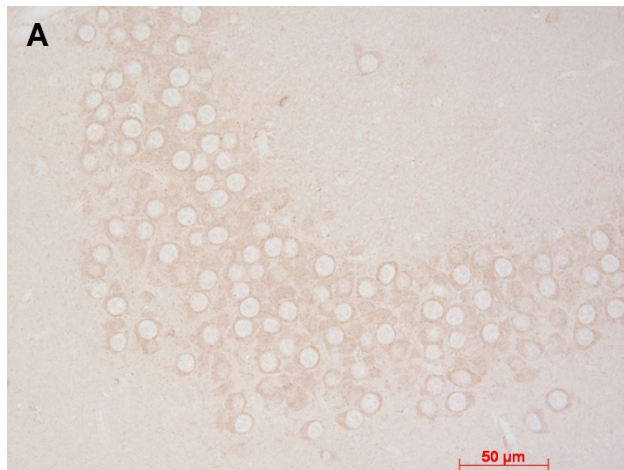
Soman + 72 h



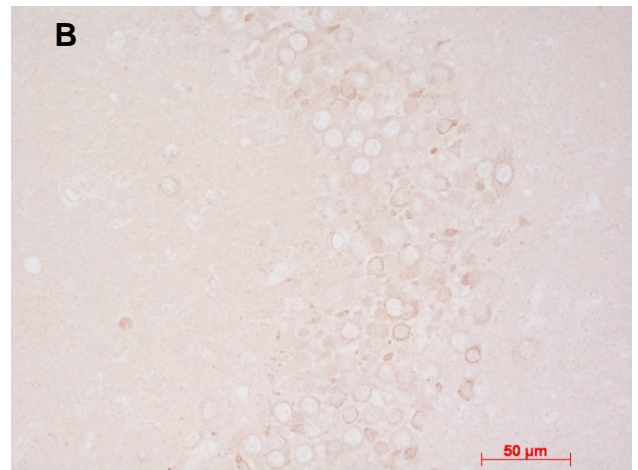
Soman + 7 j

Amygdale

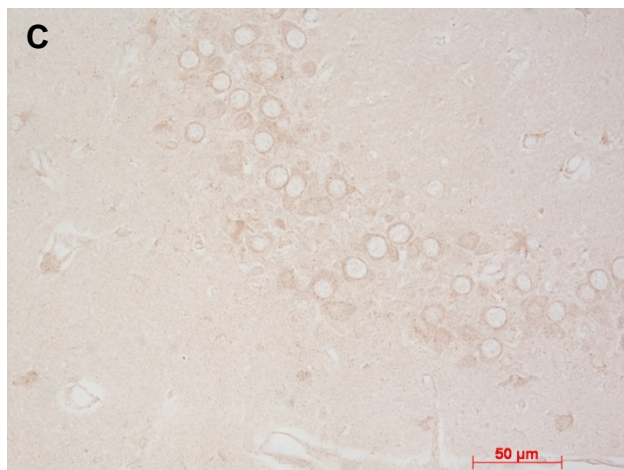
Figure n° 35 : Marquage immunohistochimique de la protéine hPGDS chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μg/kg ; s.c.).
Les planches présentent l'amygdale d'animaux témoins (A) et d'animaux sacrifiés 72 h (B) et 7 j (C) après intoxication. Barre d'échelle = 50 μm.



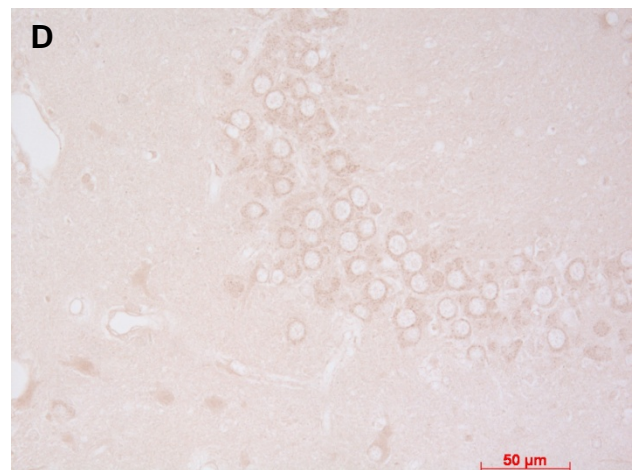
A
Témoins



B
Soman + 12 h



C
Soman + 72 h



D
Soman + 7 j

CA3

Figure n° 36 : Marquage immunohistochimique de la protéine mPGES-1 chez la souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μg/kg ; s.c.). Les planches présentent la région CA3 d'animaux témoins (A) et d'animaux sacrifiés 12 h (B), 72 h (C) et 7 j (D) après intoxication. Barre d'échelle = 50 μm.

III.3.2.4 Prostaglandine E-synthase microsomale de type 1 (m-PGES-1)

Chez les animaux témoins, quelles que soient les structures étudiées, on observe un très faible immunomarquage (Figure n° 36-A) qui ne varie pas significativement au cours du temps après l'intoxication (Figure n° 36-B, C et D : aire CA3).

Structures	Immuno-marquage	To Soman +								
		To	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	7 j
Septum latéral	cPLA2 α							+	+	+
	COX-2									
	hPGDS						+	++	++	+
	mPGES-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Striatum	cPLA2 α									
	COX-2									
	hPGDS						+	++	++	
	mPGES-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cortex piriforme	cPLA2 α							+	+	+
	COX-2			++	++	++	++	++	+	+
	hPGDS						+	+	+	+
	mPGES-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thalamus dorsal	cPLA2 α									
	COX-2			+	+	+				
	hPGDS						+	++	++	++
	mPGES-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdale	cPLA2 α							+	+	+
	COX-2			+	+	++	++	++	+	+
	hPGDS						+	++	++	++
	mPGES-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hippocampe – CA1 (couche pyramidale)	cPLA2 α								+	+
	COX-2				+	+	+	+	+	
	hPGDS						+	+	+	++
	mPGES-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hippocampe – CA3 (couche pyramidale)	cPLA2 α								+	+
	COX-2			+	++	++	++	++	++	+
	hPGDS						+	+	+	+
	mPGES-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gyrus denté (couche granulaire)	cPLA2 α							+(sub)	+(sub)	+(sub / sup)
	COX-2				+				+	+
	hPGDS						+	+	+	
	mPGES-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau n° 7 : Étude immunohistochimique de l'expression de différents acteurs de la voie des eicosanoïdes (cPLA2 α , COX-2, hPGDS et mPGES).

Gris = absence de marquage ; + = très faible marquage ou très peu de cellules marquées ; ++ = marquage important ou nombreuses cellules marquées ;

sub : zone subgranulaire du GD ;

sup : zone supragranulaire du GD.

III.3.3 Étude des variations cérébrales de l'activité d'enzymes de la voie des eicosanoïdes

Les mesures d'activités enzymatiques PLA2 totales et COX totales n'ont pas permis de mettre en évidence de variation d'activité significative entre le lot témoin et les différents temps d'études. On remarque cependant une tendance à l'augmentation de l'activité COX totale dans l'hippocampe, à 24 h et 48 h, suivie d'une nette diminution de cette activité à 72 h et 7 j, sans pour autant représenter une variation statistiquement significative par rapport au lot témoin (Figure n° 37).

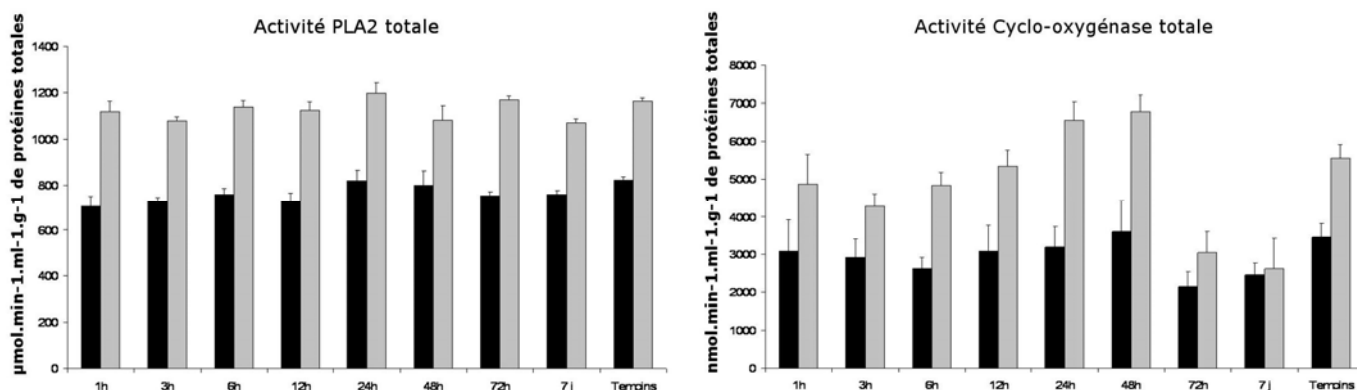


Figure n° 37 : Variations sur 7 jours des activités enzymatiques PLA2 totale et COX totale dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de souris après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 $\mu\text{g}/\text{kg}$; s.c.).

Pour chaque temps d'étude, le résultat représente la moyenne (\pm ES) de l'activité enzymatique. Les comparaisons ont été réalisées pour chaque lot (n = 6-8), par rapport au lot témoin (n = 14).

IV. Éléments de discussion

IV.1 Intoxication par le soman : conséquences sur l'état général et sur le développement de lésions cérébrales chez les animaux intoxiqués

L'utilisation chez la souris d'une dose de soman de 172 µg/kg (1,6 DL₅₀ en absence de HI-6 ; 0,6 DL₅₀ en présence de HI-6), précédée d'un prétraitement à l'HI-6, conduit au développement de crises convulsives de longue durée, avec un taux de survie satisfaisant jusqu'à 7 j.

Les animaux inclus dans nos expérimentations ont présenté des signes d'encéphalopathie sévère, systématiquement accompagnée d'une dégradation de leur état général, d'une forte perte de poids à J1 (> 15 %), avec persistance d'un déficit de masse corporelle jusqu'à 7 j post-intoxication.

Nos résultats montrent l'association entre les convulsions de longue durée et le développement de lésions cellulaires majeures. Ils concordent avec d'autres expérimentations ayant établi le lien étroit entre la durée des crises convulsives et l'importance des dommages cérébraux (Baille et al. 2005). Ces résultats peuvent aussi être rapportés à des observations ayant montré une relation entre l'activité électro-encéphalographique (EEG) et le développement d'une encéphalopathie (Carpentier et al. 2000, Carpentier et al. 2001). Des expérimentations réalisées dans notre laboratoire ont conduit à montrer une stricte correspondance entre le développement de crises convulsives et l'existence de crises épileptiques mises en évidence par EEG. Dans notre modèle, les observations cliniques des convulsions semblent donc suffisantes pour détecter le développement de crises épileptiques en l'absence d'enregistrement EEG.

Enfin, les données concernant le suivi pondéral confirment les résultats d'autres études ayant préalablement établi l'existence d'une forte corrélation entre l'intensité des lésions

cérébrales et la perte de masse corporelle initiale avec maintien du déficit pondéral pendant les jours suivant l'intoxication (Churchill et al. 1985, Filliat et al. 2007).

IV.2 Cinétique du développement des lésions et des modifications cellulaires du parenchyme cérébral à la suite de l'intoxication par une dose convulsivante de soman

IV.2.1 Dommages cellulaires

La coloration H&P a permis de révéler la présence de cellules en souffrance dès la première heure post-intoxication dans le septum latéral, le cortex piriforme et l'amygdale. Dans la plupart des zones observées, la proportion de cellules éosinophiles est maximale dans les heures suivant l'intoxication, généralement entre 6 h et 24 h après le début des crises. Ces images de cellules en souffrance, puis de morts cellulaires, apparaissent donc rapidement après le début des crises convulsives. Ceci peut s'expliquer par les mécanismes d'excitotoxicité décrits dans la première partie, en lien avec l'augmentation précoce de la concentration extracellulaire de glutamate (voir p. 58).

Les pertes cellulaires importantes observées dans certaines régions (CA1, CA3, cortex piriforme...) 7 j après l'intoxication sont liées aux morts cellulaires ayant eu lieu antérieurement, ces cellules n'étant alors plus visibles après plusieurs jours.

Dans certaines zones du cerveau, on observe cependant un grand nombre de cellules éosinophiles à des temps tardifs. Dans la couche pyramidale de l'aire CA1 de l'hippocampe, la proportion de cellules éosinophiles s'est révélée maximale à 72 h, et reste soutenue à 7 j. Ceci semble montrer que les lésions cellulaires ne surviennent pas uniquement pendant, ou immédiatement après l'EME, mais se poursuivent après la fin des crises d'épilepsie. Ce phénomène de morts cellulaires retardées a déjà été rapporté dans notre laboratoire après intoxication par le soman chez la souris (B6D2F1) sur une durée encore plus importante

puisque il a été constaté dans la zone CA1 de l'hippocampe et dans l'amygdale entre 60 et 90 j après l'intoxication (Collombet et al. 2006, Collombet et al. 2008).

Des mécanismes plus complexes que ceux liés à la phase initiale d'excitotoxicité (voir p. 43) engendrée par l'augmentation extracellulaire du glutamate sont donc susceptibles d'intervenir dans le développement des lésions cellulaires à la suite de l'EME induit par le soman. Les différentes perturbations physiologiques (dégradation de l'hémodynamique cérébrale, augmentation de la PIC, hypoxie, hypoglycémie) (Ichai et al. 1996) et neurochimiques (débordement des systèmes anticonvulsivants endogènes, modifications morphologiques des récepteurs GABA) décrites lors des EME chez l'homme (Chen et Wasterlain 2006) sont susceptibles d'être impliquées lors de l'intoxication par le soman (Carpentier et al. 2008). Parmi les facteurs pouvant expliquer les morts cellulaires retardées, la mise en place d'une réponse inflammatoire prolongée dans le SNC tient certainement un rôle majeur.

IV.2.2 Modifications cellulaires du parenchyme cérébral et réaction inflammatoire

Nous avons mis en évidence une activation microgliale à partir de 12 h alors que l'activation astrocytaire a été détectée à partir de 48 h. Cette réaction accompagne généralement le développement de lésions cellulaires et tissulaires associées à l'EME induit par l'injection systémique de soman (Baille-Le Crom et al. 1995, Baille et al. 2005, Zimmer et al. 1997). Les premiers stades d'activation microgliale ou astrocytaire ont été détectés postérieurement aux premiers signes de souffrance cellulaire et d'œdème tissulaire.

La présence d'un nombre important de cellules marquées par la GSA-IB4 (cellules microgliales ou macrophages activés) a pu être constatée dans les zones où des pertes neuronales importantes sont observées. Ces cellules deviennent hyper-ramifiées à partir de

12 h, puis de forme amiboïde à partir de 48 h. Au stade amiboïde, elles disposent de capacités cytotoxiques susceptibles d'aggraver les lésions cellulaires initiales.

La modification du marquage des cellules microgliales par la GSA-IB4 à 7 j, qui prend un aspect « dilué », ne peut s'expliquer par la chronologie d'évolution de l'activation de ce type cellulaire. Une altération comparable du marquage des cellules microgliales, au-delà de 7 j après le stimulus excitotoxique initial, a déjà été constatée dans notre laboratoire sur d'autres modèles d'EME par injection intrahippocampique d'acide kaïnique chez la souris (Pernot 2009). Cette modification du marquage ne doit pas conduire à la conclusion d'une diminution de la présence de cellules microgliales à ce temps d'étude. En effet, d'autres auteurs ont montré la présence de cellules microgliales activées dans l'hippocampe dans un modèle d'épilepsie 7 j après injection intrahippocampique d'acide kaïnique et détection immunohistochimique d'Iba1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*) (Heinrich et al. 2006). La diminution du marquage des cellules microgliales que nous avons pu constater au 7^{ème} jour est donc probablement liée à la technique utilisée, qui fait appel à une lectine. Des modifications influençant l'accessibilité des composants de la membrane des cellules microgliales et la réactivité de la lectine (variations du microenvironnement extracellulaire des zones cérébrales fortement lésées par exemple) pourraient expliquer ces observations (Navarro 2007, Takahashi et al. 2008).

Les cellules gliales font partie des éléments clés de la réponse inflammatoire dans le SNC. L'activation gliale mise en évidence dans notre modèle de lésions cérébrales d'origine cytotoxique concorde avec les phénomènes d'activation microgliale et astrocytaire décrits dans la plupart des autres modèles d'EME. On peut cependant remarquer que l'activation gliale détectée dans notre modèle paraît légèrement plus tardive que dans un autre modèle d'EME induit par le soman chez le rat. En effet, une activation microgliale a été mise en évidence entre 1 h et 4 h par Zimmer et al. (1997). Une augmentation de l'ARNm de GFAP a

été révélée dans l'hippocampe 6 h après le début des crises par Baille et al. (1995) et une augmentation de l'expression de la protéine GFAP a été montrée dans le cortex piriforme dès 1 h après l'intoxication par Zimmer et al (1997).

Le faible niveau d'expression de la protéine GFAP à 48 h - 72 h dans des portions circonscrites du cortex piriforme, de l'amygdale et de l'aire CA3 de l'hippocampe, en comparaison avec les autres zones cérébrales lésées, a d'ores et déjà été relevé dans d'autres expérimentations d'intoxications par le soman (Baille et al. 2005). Il s'agit de zones dans lesquelles de très fortes pertes neuronales sont habituellement constatées. Un phénomène comparable a été décrit dans le GD pour un modèle d'EME induit par la pilocarpine chez la souris (Borges et al. 2006), mais aussi pour la couche pyramidale de CA3 après injection d'acide kaïnique chez le rat (Jorgensen et al. 1993). Cette absence de cellules GFAP-positives peut s'expliquer par la destruction des astrocytes puisque, comme les cellules neuronales, ces cellules sont sensibles à l'excitotoxicité causée par le glutamate en excès (Matute et al. 2006, Matute et al. 2002). Cette disparition des astrocytes dans les zones de forte nécrose cellulaire a déjà été relevée chez le rat après administration d'acide kaïnique, en lien avec la désorganisation du cytosquelette astrocytaire (Dusart et al. 1992). Ces pertes astrocytaires pourraient avoir des conséquences délétères sur la survie neuronale en raison des rôles potentiellement bénéfiques attribués aux astrocytes (Barres et Barde 2000). Par ailleurs, nos résultats contrastent avec les résultats obtenus pour le même modèle d'intoxication montrant qu'à 7 j, le marquage de GFAP dans ces zones fortement lésées était toujours absent (Baille et al. 2005). Nos expérimentations ont permis une nouvelle détection à 7 j d'astrocytes activés dans la totalité de l'hippocampe, avec une expression soutenue de la protéine GFAP. Actuellement, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer cette dernière observation.

Nous avons aussi constaté une activation gliale (microglie et astrocytes) dans la couche granulaire du GD, en l'absence de dommages détectables avec le marquage H&P. La gliose

réactive est caractéristique de nombreux modèles d'épilepsie. Les limites de cette étude peuvent être liées au marquage H&P, incapable de révéler certaines formes de dommages neuronaux fins (modifications axonales, dendritiques, etc.). Elles peuvent également s'expliquer par le fait que nous n'avons pas effectué d'analyse quantitative fine du nombre de cellules, et que la disparition de quelques neurones a pu passer inaperçue. Il est par ailleurs possible qu'aucun événement neurodégénératif ne prenne place dans la couche granulaire du GD, les processus de mort cellulaire et d'œdème tissulaire se limitant aux bordures subgranulaires et supragranulaires, ainsi qu'à la couche polymorphe du GD. Un phénomène semblable d'activation gliale dans l'hippocampe en l'absence de neuropathie a été mis en évidence dans un modèle d'épileptogenèse par injection intrahippocampique de soman (Pernot 2009). D'autres signaux pourraient expliquer ce phénomène d'activation gliale en l'absence de neuropathie :

- l'hypercholinergie : il a été montré que les astrocytes hippocampiques possèdent des récepteurs cholinergiques (Hosli et Hosli 1988) et qu'ils sont rendus excitables par l'activation muscarinique (Araque et al. 2002) ;
- l'augmentation de l'activité électrique neuronale : ce phénomène a été constaté dans un modèle d'épilepsie par embrasement caractérisé par une absence de neurodégénérescence ; l'activité électrique est suffisante pour déclencher une activation gliale, mais insuffisante pour déclencher des dommages cellulaires détectables par la coloration H&P (Khurgel et al. 1995).

Le marquage intense par la GSA-IB4 atteste de la présence de nombreuses cellules microgliales ou macrophagiques activées. En effet, le marquage utilisé ne permet pas de différencier les cellules microgliales endogènes des cellules macrophagiques liées à l'infiltration monocyttaire à la suite du franchissement de la BHE. Parallèlement à l'activation des cellules microgliales endogènes, des macrophages d'aspect polymorphonucléaires ont été

détectés après intoxication par le soman chez la souris (Baille et al. 2005). La mise en évidence du passage de GNN entre 12 h et 72 h à proximité des zones lésées, semble confirmer l'existence d'une infiltration du parenchyme cérébral par des cellules circulantes après intoxication par le soman. Ces cellules peuvent avoir un rôle bénéfique en participant à l'élimination des débris cellulaires par leur activité macrophagique. Elles peuvent aussi avoir un impact délétère, comme cela a été montré dans d'autres modèles d'atteinte cérébrale tels que l'ischémie ou le traumatisme crânien, en raison de l'activité pro-inflammatoire et cytotoxique de ces cellules (Jiang et al. 1995, Matsuo et al. 1994, Yamasaki et al. 1997). Dans ces types d'atteinte cérébrale, le recrutement de GNN semble aggraver les lésions initiales.

IV.3 Évolution des médiateurs moléculaires de l'inflammation dans le SNC après intoxication par le soman

IV.3.1 Limites méthodologiques

Nous avons utilisé une technique de RT-qPCR quantitative en temps réel afin de quantifier les modifications de taux d'ARNm de différents médiateurs de l'inflammation, ainsi que des techniques d'IHC permettant de préciser la localisation tissulaire de certains médiateurs.

La technique de RT-qPCR quantitative en temps réel utilisée dans cette étude nous a permis de mesurer l'ARNm de plusieurs cytokines et autres marqueurs de l'inflammation présents dans les différentes structures cérébrales. La phase d'amplification de cette technique la rend particulièrement sensible, ce qui permet de détecter des variations de faible amplitude de la réponse biologique. La mesure étant réalisée sur broyat de tissus, la précision en termes de localisation des lieux de synthèse de l'ARNm reste moins performante que celle des techniques d'hybridation *in situ*.

De nombreux systèmes de régulation intervenant au niveau post-transcriptionnel sont susceptibles de moduler la quantité de protéines synthétisées à partir d'une même quantité

d'ARNm initiale. Ainsi, la détection de l'ARNm par RT-qPCR ou hybridation *in situ* ne reflète pas exactement la quantité de protéines correspondante qui sera synthétisée. La détection immunohistochimique de protéines de la voie des eicosanoïdes, correspondant à certains ARNm recherchés, a permis de vérifier que l'augmentation de ces ARNm était suivie de la production de la protéine correspondante, et de connaître la localisation précise des protéines synthétisées.

Une autre limite potentielle de la quantification d'ARNm consiste en l'impossibilité de certifier qu'une augmentation du taux relatif d'ARNm corresponde nécessairement à une augmentation de sa synthèse. En effet, une élévation du taux d'ARNm peut résulter d'une augmentation de sa stabilisation, le rendant moins sensible aux mécanismes habituels de dégradation. Néanmoins, l'ensemble des gènes étudiés étant fortement inductibles, il est raisonnable de penser que les augmentations de taux relatif d'ARNm observées sont liées à une augmentation de leur synthèse.

IV.3.2 Intoxication par le soman et cytokines pro-inflammatoires

Une augmentation du taux relatif des ARNm étudiés a été mise en évidence dans plusieurs structures cérébrales au cours de l'intoxication par le soman. Cette augmentation n'est pas observée dans le lot témoin d'animaux ayant reçu un prétraitement par l'HI-6, pour aucun des marqueurs de l'inflammation que nous avons étudiés chez la souris. Nos conditions expérimentales ne permettent pas de comparer nos résultats avec ceux de Svensson et al. (2005) qui, chez le rat, avaient mis en évidence une augmentation transitoire des taux d'ARNm d'IL-1 β 30 min après administration d'HI-6 (50 mg/kg, i.p.). Cette augmentation n'était constatée que dans le cortex frontal et n'était plus détectable 6 h après l'administration d'HI-6, ce qui correspond à notre premier temps d'étude pour les animaux témoins.

Pour les effets de l'intoxication, nos résultats présentent des différences avec les travaux de certaines équipes (Svensson et al. 2005, Svensson et al. 2001, Williams et al. 2003). En effet, dans leurs études, ces auteurs montrent une augmentation de l'ARNm de l'IL-1 β dans le cortex (Williams et al. 2003) et l'hippocampe (Svensson et al. 2001, Williams et al. 2003), statistiquement significative uniquement 6 h après l'intoxication, et n'apparaissant jamais dans le cervelet (Svensson et al. 2001). Dans nos expérimentations, une telle augmentation est détectée dès la première heure dans le cortex et subsiste à un niveau élevé de 6 h à 7 j dans l'hippocampe, et à un taux plus faible de 30 min à 48 h dans le cervelet. Pour les autres ARNm étudiés par Williams et al. (2003) dans le cortex et l'hippocampe, des augmentations significatives ne sont généralement observées qu'aux temps 2 h pour le TNF α dans le cortex, et 6 h pour l'IL-6 dans le cortex et ICAM-1 dans le cortex et l'hippocampe. Comme le montrent nos résultats, la période post-intoxication pour laquelle les ARNm montrent une surexpression significative est beaucoup plus large, quelles que soient les structures considérées. Les différences peuvent provenir du modèle animal (souris *vs* rat) ou du modèle d'intoxication (utilisation de nitrate de méthyl-atropine (NMA) en plus d'HI-6 chez Williams et al. (2003) ; absence de prétraitement chez Svensson et al. (2001). En revanche, la dose de soman étant dans tous les cas convulsivante, et donc susceptible d'entraîner un EME, il ne semble pas qu'elle puisse être incriminée majoritairement dans les différences observées. D'autres explications de ces différences pourraient résider dans la nature exacte des structures prélevées (Williams et al. (2003) ont centré le prélèvement du cortex sur le cortex piriforme) ou de la fiabilité de la technique de RT-qPCR (dessin des amorces, normalisation par l'utilisation de 4 gènes de référence validés *vs* 1 gène rapporteur).

La relation entre la neuropathie, la réponse inflammatoire cellulaire et la réponse inflammatoire moléculaire est clairement suggérée, mais les liens qui régissent ces différents phénomènes restent à préciser. Les premiers effets morphopathologiques peuvent être détectés

dès 30 min par la disparition massive des épines dendritiques (Carpentier et al. 1991) puis par l'apparition d'un œdème et de cellules éosinophiles visibles dès la première heures qui suit l'intoxication. Les morts cellulaires déjà détectables à 24 h continuent dans les jours suivants. D'après ces données et nos propres observations, la stimulation des marqueurs de l'inflammation et la neuropathie se déroulent globalement simultanément. Ceci suggère une origine commune et/ou un déroulement parallèle des deux événements. L'hypercholinergie qui s'instaure très rapidement après l'intoxication et l'hyperstimulation des récepteurs muscariniques puis glutamatergiques, au départ des convulsions et des lésions associées, induit probablement une augmentation de l'expression d'un certain nombre de gènes. En effet, une induction de la transcription du gène de régulation *c-fos* a été démontrée dès les 30 premières min après intoxication au soman (Baille-Le Crom et al. 1996). De même, les liens entre l'activation gliale, l'induction des médiateurs pro-inflammatoires (ARNm et protéines) et l'augmentation de l'activité glutamatergique à l'origine des crises d'épilepsie (Dube et al. 2005, Vezzani et al. 1999a, Vezzani et al. 2002, Vezzani et al. 2000) et de l'excitotoxicité associée (Bernardino et al. 2005, Viviani et al. 2004, Viviani et al. 2003) a été démontrée dans de nombreux modèles d'EME (Vezzani et al. 2008).

Bien que présentant globalement des similitudes, les résultats obtenus dans le cortex et l'hippocampe en termes quantitatif et cinétique apparaissent bien différents quand ils sont étudiés dans le détail. Concernant l'augmentation de la concentration des ARNm des médiateurs de l'inflammation, il faut noter par exemple que le cortex réagit environ 4 h avant l'hippocampe. En première analyse, ceci ne semble pas être en lien avec l'hypothèse dans laquelle l'hyperactivation électrique du cortex précède celle de l'hippocampe. En effet, des travaux utilisant des électrodes profondes ont montré que l'hippocampe était stimulé, à quelques secondes près, en même temps que le cortex au début de l'intoxication par le soman (McDonough et Shih 1993). Toutefois, la cascade d'événements conduisant à l'expression des

gènes des médiateurs de l'inflammation recherchés pourrait se propager à des vitesses différentes dans l'hippocampe ou le cortex, structurellement, fonctionnellement et neurochimiquement très différents.

Dans le cervelet, nos résultats montrent qu'une stimulation significative et de faible amplitude ne concerne que trois médiateurs de l'inflammation (IL-1 β , SOCS3 et ICAM-1). Une augmentation non significative est observée 2 h après l'intoxication pour les deux autres molécules (TNF α et IL-6). Le cervelet est une zone relativement protégée (en termes de fréquence, sévérité et étendue des lésions) de l'encéphalopathie induite par le soman (Carpentier et al. 1990, Lemerrier et al. 1983). Dans l'hypothèse d'une forte corrélation entre l'encéphalopathie induite par le soman et la réponse inflammatoire, la faible augmentation du taux des ARNm recherchés serait justifiée. Cependant, une faible réponse neuro-inflammatoire peut s'expliquer même en l'absence de lésions cellulaires. Les neurones ou les cellules gliales du cervelet pourraient être stimulées par une faible augmentation de la concentration de glutamate, pouvant conduire à un début de réponse inflammatoire sans pour autant entraîner le déclenchement de mécanismes excitotoxiques. L'hypothèse d'une stimulation endocrine à partir d'une autre zone cérébrale lésée ne doit pas être exclue. Les médiateurs inflammatoires libérés dans ces structures lésées pourraient diffuser jusqu'au cervelet par l'intermédiaire du sang ou du liquide interstitiel et provoquer une réponse inflammatoire à distance. En outre, d'autres expérimentations font état de l'activation de certains gènes en cas d'exposition à des faibles doses de sarin chez la souris, ces doses étant incapables de produire des convulsions ou une encéphalopathie (McDougal 2004). Ces éléments suggèrent l'existence d'une relative indépendance entre la stimulation de ces gènes et l'encéphalopathie.

SOCS3 est une protéine qui module l'activité de l'IL-6 (Croker et al. 2003, Fujimoto et Naka 2003, Lang et al. 2003). Nous avons décidé d'inclure la recherche de l'induction de

l'ARNm de SOCS3 car sa synthèse, totalement inductible, est déclenchée par l'augmentation du taux de certaines cytokines de la famille de l'IL-6 (Lang et al. 2003). La forte corrélation entre la cinétique d'induction des ARNm de SOCS3 et d'IL-6 nous permet d'émettre l'hypothèse que la synthèse d'IL-6 induite par le soman est à l'origine de l'induction de SOCS3. L'augmentation de l'ARNm de SOCS3 permet ainsi de supposer que l'augmentation de l'ARNm d'IL-6 a été suivie d'une augmentation de la synthèse de la protéine (ou d'une autre cytokine de la même famille).

La comparaison de l'augmentation du taux d'ARNm des cytokines pro-inflammatoires après intoxication par le soman avec les résultats obtenus dans d'autres modèles d'EME permet d'établir des rapprochements intéressants. L'augmentation du taux d'ARNm de l'IL-1 β avait depuis longtemps été mise en évidence après déclenchement d'un EME par l'administration systémique d'acide kaïnique (Minami et al. 1990). Le même profil biphasique d'augmentation de taux relatif d'ARNm de l'IL-1 β est retrouvé, avec quelques différences puisque dans le cas de l'acide kaïnique, le 2^{ème} pic d'ARNm de l'IL-1 β dans l'hippocampe est détecté à 12 h, alors qu'il est plus tardif dans notre modèle (48 h). Par ailleurs, cette augmentation semble moins durable dans le cas de l'administration d'acide kaïnique puisqu'un retour au taux de base est constaté au 4^{ème} jour (Eriksson et al. 2000, Lehtimaki et al. 2003), alors que la normalisation n'est toujours pas atteinte au 7^{ème} jour dans notre modèle. Un profil quelque peu différent est observé dans le modèle de stimulation électrique de l'hippocampe ventral chez le rat : une augmentation du taux d'ARNm de l'IL-1 β est détectée dès 2 h dans l'hippocampe, et un maximum à 6 h après le début de l'EME (De Simoni et al. 2000).

Des modifications du taux d'ARNm de TNF α comparables à celles observées dans notre modèle ont été mises en évidence dans le cas de l'EME induit par l'administration

systemique d'acide kaïnique, puisqu'une augmentation du taux d'ARNm a été détectée entre 2 h et 4 h après le début de l'EME dans différentes structures cérébrales chez le rat (Lehtimaki et al. 2003, Minami et al. 1991). Dans ce même modèle, l'augmentation du taux de l'ARNm de TNF α dans l'hippocampe a été mise en évidence 4 h après l'induction de l'EME (Jankowsky et Patterson 2001), ce qui est très proche de nos résultats puisque nous avons mis en évidence cette augmentation à 6 h et que nous n'avons pas de données concernant ces événements entre 2 h et 6 h. Les résultats obtenus dans le modèle d'EME par stimulation électrique de l'hippocampe ventral chez le rat semblent montrer quelques différences puisque l'augmentation de la concentration de l'ARNm du TNF α s'est révélée maximale à 6 h dans l'hippocampe (De Simoni et al. 2000), alors que le pic est plus tardif – à 24 h - 48 h – dans notre modèle.

Nos résultats, mettant en évidence une augmentation rapide et transitoire de l'ARNm de l'IL-6, corroborent les données de différents modèles d'EME. En effet, quel que soit le stimulus initial, l'augmentation de l'ARNm de l'IL-6 est détectée initialement entre 2 h et 6 h après le début des crises dans différentes structures cérébrales ; le retour à la normale est constaté au-delà de 48 h pour l'ensemble des structures étudiées. Ces données retrouvées suite à un EME induit par l'administration systémique d'acide kaïnique (Lehtimaki et al. 2003), de pilocarpine (Rosell et al. 2003), ou par stimulation électrique de l'hippocampe (De Simoni et al. 2000), concordent avec les résultats issus de notre modèle.

IV.3.3 Intoxication par le soman et infiltration du parenchyme cérébral par des cellules périphériques

La réponse neuro-inflammatoire n'est pas seulement liée à l'activation de cellules résidentes dans le SNC, mais est influencée par des facteurs inflammatoires périphériques cellulaires ou moléculaires.

Le passage de leucocytes circulants vers le SNC, traversant la BHE, a été décrit dans différents types d'atteintes cérébrales (Rebenko-Moll et al. 2006, Turowski et al. 2005, Wong et al. 2007) et en particulier à la suite d'un EME (Fabene et al. 2008), mais aussi dans le cerveau sain, dans des structures telles que l'hippocampe, le cortex et le thalamus. Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle majeur dans ce phénomène en favorisant l'augmentation de synthèse de chimiokines et de molécules d'adhésion qui permettront l'infiltration du parenchyme par les cellules immunitaires périphériques (Frijns et Kappelle 2002, Imaizumi et al. 2004).

Nous avons mis en évidence une augmentation du taux relatif des ARNm des chimiokines CXCL1, CCL5 et des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1. Ces résultats concordent avec les travaux de Williams et al. (2003) qui, dans un autre modèle d'intoxication par le soman chez le rat, ont montré une augmentation de l'induction des ARNm de ces deux molécules d'adhésion et de la sélectine-E.

Dans nos expérimentations, l'augmentation rapide et transitoire du taux d'ARNm de CXCL1, qui favorise préférentiellement le recrutement des GNN (Barsante et al. 2008, Pease et Williams 2006, Soares et al. 2008), est cohérente avec nos résultats montrant une infiltration précoce et transitoire du parenchyme cérébral par des GNN.

L'induction de l'ARNm de CCL5, qui favorise préférentiellement le recrutement des cellules T et des monocytes (Ubogu et al. 2006, Viola et Luster 2008), s'est révélée plus tardive que celle de CXCL1. Cette cinétique d'induction décalée est similaire à ce qui a pu être observé en clinique humaine dans le cas du TC, montrant une augmentation du taux d'ARNm de CCL5 dans le parenchyme cérébral uniquement à compter du 4^e jour après le traumatisme (Stefini et al. 2008). Cette augmentation retardée du taux d'ARNm de CCL5, tout comme celle de VCAM-1, suggère l'existence de mécanismes favorisant l'infiltration du

parenchyme cérébral à distance de l'EME initial. Cette infiltration tardive est susceptible de contribuer à la production retardée de médiateurs de l'inflammation et peut être rapprochée des observations réalisées sur des modèles d'ischémie cérébrale, et avec le concept de réponse neuro-inflammatoire bi-phasique : après une production initiale de cytokines d'origine centrale, une 2^{ème} vague inflammatoire dépend de la production de médiateurs par les cellules périphériques ayant infiltré le parenchyme cérébral (Matsuo et al. 1994, Pantoni et al. 1998, Phillips et al. 2000).

Ne disposant d'aucune technique qui permette de différencier les cellules microgliales résidentes des monocytes/macrophages d'origine périphérique chez la souris, nous n'avons pu montrer l'existence de ce phénomène que pour les GNN, et non pour les monocytes. Cependant, dans un autre modèle d'EME par administration systémique de pilocarpine chez le rat, la présence transitoire de cellules rondes CD11b⁺/CD14⁺ a été mise en évidence dans le parenchyme de l'hippocampe 24 h après le début des crises. Ces cellules ont été détectées principalement dans la bordure leptoméningéale de la couche moléculaire externe du GD, ainsi que dans la couche moléculaire du GD et du hile (Navarro 2007). Ce marquage CD14 pourrait ainsi permettre de déterminer si les cellules rondes CD11b⁺ sont des cellules microgliales résidentes (CD14⁻) ou des cellules d'un autre type telles que des monocytes, des macrophages des leptoméniges, ou encore des cellules périvasculaires (CD14⁺). Alors que les cellules microgliales activées expriment CD14 *in vitro*, une expression similaire *in vivo* n'a pas été mise en évidence. Si cela était confirmé, le marquage CD14 permettrait de différencier la microglie et les monocytes infiltrés dans le parenchyme cérébral. A ce jour, aucune étude n'a permis de confirmer cette hypothèse en montrant que le marqueur CD14 n'était pas exprimé par la microglie activée *in vivo*. Cette infiltration précoce du parenchyme cérébral par les monocytes à la suite d'un EME reste donc à confirmer.

Au-delà du rôle de « nettoyage » par phagocytose des zones de nécrose ou de production de composés cytotoxiques, l'infiltration du parenchyme cérébral semble avoir des répercussions majeures sur les conséquences d'un EME initial. Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce travail, le passage de leucocytes à travers la BHE perméabilisée par la réaction inflammatoire est étroitement lié à l'entretien de la réaction inflammatoire centrale et au maintien de l'hyperexcitabilité neuronale, notamment par l'intermédiaire de l'IL-1 β (Marchi et al. 2009, Shaftel et al. 2007). La réaction inflammatoire est susceptible d'augmenter la perméabilité de la BHE, ce qui favorise une altération de l'homéostasie tissulaire cérébrale et le développement de l'épileptogenèse à la suite d'un EME initial (Ivens et al. 2007, Seiffert et al. 2004). Sur un plan thérapeutique, la limitation de l'infiltration des leucocytes par la prévention de leur adhésion à l'endothélium vasculaire a d'ailleurs permis de diminuer la récurrence des crises consécutives à un EME initial, ainsi que les lésions cellulaires associées (Fabene et al. 2008).

L'action de ces cellules périphériques et le rôle des différents médiateurs intervenant dans la modulation de l'infiltration du SNC par ces cellules inflammatoires, nécessitent d'être mieux connus dans le cadre de l'intoxication par les NOP afin d'envisager des stratégies thérapeutiques visant à maîtriser leurs effets.

IV.3.4 Étude de l'impact de l'intoxication par le soman sur les enzymes de la voie des eicosanoïdes

L'augmentation du taux de l'ARNm des phospholipases (cPLA2 α et sPLA2 IIE), plus précoce dans le cortex que dans l'hippocampe, est à rapprocher des observations faites pour la majorité des autres marqueurs de l'inflammation, avec une augmentation plus importante dans l'hippocampe aux temps tardifs.

Nous avons mis en évidence une augmentation significative du taux de l'ARNm de cPLA2 α dans l'hippocampe à partir de 6 h et persistant jusqu'à 7 j. Ces données s'opposent

aux résultats obtenus lors d'atteinte cérébrale d'origine ischémique chez le rat. Dans ce modèle, l'augmentation de l'ARNm de cPLA2 α détectée par hybridation *in situ* dans les aires CA1 et CA3 s'est révélée précoce et transitoire, avec un niveau maximal entre 6 h et 12 h, et un retour à la normale à 24 h (Owada et al. 1994). La comparaison avec nos résultats reste cependant difficile en raison de la différence de technique mise en œuvre, puisque nous utilisons un broyat de la totalité de l'hippocampe qui ne permet pas de différencier des modifications de la concentration d'ARNm dans différentes sous-structures de l'hippocampe (CA1, CA3, hile, GD), comme le permet l'hybridation *in situ*.

Concernant l'expression de la protéine cPLA2 α , on retrouve une concordance partielle avec l'EME induit par l'administration systémique d'acide kaïnique (Sandhya et al. 1998). Le marquage des cellules pyramidales de l'hippocampe, mis en évidence à partir de 72 h dans notre modèle, a été détecté légèrement plus précocement dans les neurones dégénérésents de la couche pyramidale de CA1 et CA3, 24 h et 72 h dans ce modèle. L'expression persistante de cPLA2 α dans l'ensemble de l'hippocampe 7 j après l'intoxication par le soman a aussi été constatée dans le modèle kaïnate dans lequel la production de cPLA2 α a été attribuée aux astrocytes à ce temps d'étude (Sandhya et al. 1998). Nous n'avons pas procédé à des doubles marquages permettant d'identifier les cellules productrices des protéines étudiées, et de conclure à une expression de cPLA2 α par les neurones, puis par les astrocytes activés. Cependant, ces données sont cohérentes avec nos résultats qui montrent une activation astrocytaire dans l'hippocampe débutant à 48 h dans CA1, et maximale à 7 j dans l'ensemble de l'hippocampe. Parallèlement, à 7 j, le marquage de cPLA2 α qui était restreint aux corps cellulaires des cellules pyramidales de CA1, s'étend à l'ensemble de l'hippocampe, dont le *stratum radiatum* et le *stratum oriens*, où une activation astrocytaire maximale a été mise en évidence à 7 j. On remarquera que l'ensemble des zones lésées a montré une surexpression de

la cPLA2 α par rapport aux témoins, à l'exception du thalamus et du striatum où l'immunoréactivité est restée faible à tous les temps d'études.

La comparaison des variations de l'ARNm de la sPLA2 IIE que nous avons étudiées avec les phénomènes décrits dans d'autres modèles d'EME, est difficile car peu d'études ont concerné les variations d'expression de cette isoforme. Dans un modèle d'EME induit par l'administration systémique d'acide kaïnique, une augmentation significative du taux d'ARNm n'a été mise en évidence dans l'hippocampe, que 2 et 4 h après l'injection, limitée à des niveaux respectifs de 5,1 et 5,5 fois le taux de base (Kolko et al. 2006). Ces données contrastent avec nos résultats qui montrent une augmentation du taux d'ARNm allant jusqu'à 25 et 109 fois le niveau de base dans l'hippocampe, 24 h et 48 h après l'intoxication. L'utilisation du seul gène 18S comme gène de référence pourrait expliquer en partie les plus faibles variations mises en évidence dans cette étude. En effet, l'expression de ce gène 18S a été montré comme particulièrement instable à la suite de l'injection intra-hippocampique d'acide kaïnique (Pernot et al. 2010). Inversement, nos résultats ont été normalisés par rapport à une combinaison de gènes de référence dont la stabilité au cours de notre expérimentation a été vérifiée (voir p. 272).

Par ailleurs, nos résultats concernant l'augmentation des taux d'ARNm de cPLA2 α et sPLA2 IIE, ainsi que l'expression accrue de cPLA2 α détectée par IHC semblent en contradiction avec l'absence de modifications de l'activité enzymatique PLA2 mesurée dans les mêmes structures cérébrales entre 30 min et 7 j après l'intoxication. Nous ne disposons pas d'éléments pour expliquer ces résultats apparemment contradictoires. Cependant, les modifications d'ARNm que nous avons recherchées ne concernent que cPLA2 α et la sPLA2 IIE, alors qu'il existe plus de 20 PLA2 pour lesquels les ARNm ne sont pas modifiés dans notre modèle (sPLA2 F et sPLA2 V ; résultats non présentés), ou pour lesquelles nous ne

disposons pas d'informations. L'éventuelle absence de variation d'expression de ces autres PLA2 pourrait peut-être expliquer la stabilité de l'activité PLA2 globale observée dans notre étude. Les éventuelles augmentations d'activité de la sPLA2 IIE ou de la cPLA2 α seraient alors « noyées » dans l'activité PLA2 totale mesurée.

Les diverses PLA2 sont susceptibles de jouer un rôle majeur dans les processus de toxicité cellulaire constatés à la suite d'un EME induit par le soman, en favorisant l'aggravation des lésions préexistantes. Les effets des PLA2 et des cytokines pro-inflammatoires étudiées précédemment sont étroitement liés et semblent agir en synergie pour moduler l'excitotoxicité du glutamate (Kolko et al. 1996, Kolko et al. 2002). L'IL-1 β et le TNF α augmentent l'activité des sPLA2 (Anthonsen et al. 2001, Sun et Hu 1995, Wang et Shuaib 2002) et favorisent en particulier l'expression de la sPLA2 IIA (Adibhatla et Hatcher 2007). De même, la hausse de la concentration en cPLA2 α augmente la cytotoxicité du TNF α (Hayakawa et al. 1993, Rath et Aggarwal 1999).

Une fois l'acide arachidonique libéré sous l'action des phospholipases, il peut être pris en charge par les cyclo-oxygénases. Au cours de l'intoxication par le soman, une augmentation rapide et transitoire de l'ARNm de COX-2 a été observée dans le cortex et l'hippocampe. L'expression est maximale entre 2 h et 6 h, ce qui est conforme avec les données obtenues dans un modèle d'EME par administration systémique d'acide kaïnique ; dans ce cas, l'induction est maximale dans le cortex piriforme et l'hippocampe après un délai de 3 h à 4 h (Chen et al. 1995, Sandhya et al. 1998). De même, la présence d'une légère immunoréactivité basale de COX-2 dans l'hippocampe, le cortex piriforme et l'amygdale a déjà été décrite chez la souris et le rat (Andreasson et al. 2001, Sandhya et al. 1998).

La répartition neuroanatomique et la cinétique d'expression de la protéine COX-2 sont cohérentes avec celles de l'ARNm, le maximum d'expression de la protéine dans l'hippocampe et dans le cortex étant un peu plus tardif que celui de l'ARNm.

Nos résultats, comme ceux d'Angoa-Perez et al. (2010) pour un modèle de rat intoxiqué par le soman, semblent globalement mettre en évidence une colocalisation des lésions et des zones d'expression de COX-2, même si certaines zones lésées telles que le septum latéral ou le striatum ne présentent pas de surexpression de COX-2 dans nos expérimentations. Quelques différences peuvent être relevées comparativement à cette étude puisque nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de COX-2 dès 3 h dans notre modèle, alors qu'elle n'est significative qu'à partir de 24 h dans l'étude d'Angoa-Perez et al. (2010). Ces différences peuvent s'expliquer simplement par l'utilisation de deux modèles animaux différents, et sont globalement cohérentes avec les cinétiques de modification respectives des ARNm de COX-2. En effet, nous avons mis en évidence une augmentation du taux d'ARNm de COX-2 plus précoce dans notre modèle (maximum entre 2 h et 6 h dans le cortex et l'hippocampe) que dans une étude concernant le rat, chez qui l'augmentation semble plus tardive, entre 9 h et 12 h (Dillman et al. 2009). Par ailleurs, l'augmentation de marquage de la protéine COX-2 dans le GD semble nettement moins nette dans notre modèle. Ceci est probablement à mettre en relation avec la faible intensité des lésions cellulaires relevées dans le GD au cours de nos expérimentations. On remarque que dans le cas de l'intoxication par l'acide kaïnique, une intense expression de COX-2 a été décrite dans le GD (Sanz et al. 1997, Tocco et al. 1997).

Parmi les deux grands types d'immunomarquage observés, le marquage cytoplasmique pourrait concerner différents types cellulaires viables, alors que le marquage punctiforme semble correspondre à des débris cellulaires ayant exprimé COX-2. En l'absence de double marquage, il ne nous est pas possible d'identifier les types cellulaires producteurs de COX-2. Cependant, l'étude menée chez le rat 48 h après l'intoxication par le soman a permis de mettre en évidence une production de COX-2 essentiellement neuronale (Angoa-Perez et al. 2010).

Inversement, plusieurs semaines après un EME initial induit par une administration d'acide kaïnique, la source principale de COX-2 semble être astrocytaire (Sandhya et al. 1998).

Les modifications d'activité COX totale dans l'hippocampe des animaux intoxiqués ne sont pas statistiquement significatives par rapport au lot témoins. Cependant, on relève une nette tendance à l'augmentation de l'activité jusqu'à 48 h, puis une forte diminution à 72 h et 7 j. Ces éléments concordent avec l'augmentation du marquage cytoplasmique de COX-2 dans la région des cellules pyramidales de l'hippocampe jusqu'à 48 h, suivi d'une modification du marquage qui devient punctiforme aux temps d'étude 72 h et 7 j. Ce marquage punctiforme pourrait correspondre à des débris de cellules ayant exprimé COX-2. Dans l'hippocampe, COX-2, d'origine essentiellement neuronale, verrait donc son expression (ARNm et protéine) et son activité enzymatique augmentées jusqu'à 48 h, avant de chuter, en même temps que les morts neuronales sont accentuées.

Ce lien entre stimulation excessive des récepteurs du glutamate, surexpression de COX-2 et morts cellulaires retardées associées à des déficits fonctionnels, a été suggéré *in vitro* et *in vivo* dans de nombreux modèles d'atteinte du SNC comme le traumatisme crânien, l'ischémie ou l'EME induit par l'acide kaïnique (Collaco-Moraes et al. 1996, Hewett et al. 2000, Kunz et Oliw 2001, O'Banion 1999, Sandhya et al. 1998, Strauss et Marini 2002, Strauss et al. 2000), même si l'implication de COX-2 dans les morts cellulaires reste sujet de débat. L'expression précoce de COX-2 dans des structures telles que l'amygdale ou la région CA3 de l'hippocampe pourrait s'expliquer par l'augmentation du taux de glutamate extracellulaire mesuré dans ces structures lors de l'intoxication par le soman (Lallement et al. 1991a, Lallement et al. 1991c). En effet, la synthèse de COX-2 semble pouvoir être induite via le glutamate par la stimulation, avec une efficacité décroissante, des récepteurs KA, NMDA et AMPA (Strauss 2008). Par ailleurs, nos résultats montrent une absence

d'expression de COX-2 dans le septum latéral où aucune augmentation du glutamate extracellulaire n'a été détectée chez le rat au cours des 90 premières minutes après le début des crises (Lallement et al., non publié).

L'expression de COX-2 est rapide et concomitante des morts neuronales. Il semble difficile d'établir un lien de causalité entre la surexpression de COX-2 et les atteintes cellulaires précoces. L'augmentation de l'expression de COX-2 est cependant susceptible d'avoir des conséquences sur le fonctionnement cérébral en raison de la participation de COX-2 à la synthèse des PG, et en particulier de PGE₂. La présence de PGE₂ augmente l'excitabilité neuronale hippocampique (Chen et Bazan 2005) et favorise les morts neuronales après un EME induit par l'acide kaïnique (Takemiya et al. 2006). L'augmentation de la concentration de la PGE₂ a déjà été constatée dans différents modèles d'atteintes cérébrales. Parmi les modèles d'EME, une augmentation significative de la PGE₂ a été observée dans l'hippocampe 24 h après l'administration systémique d'acide kaïnique (Kawaguchi et al. 2005). Une augmentation de la PGE₂ a aussi été signalée chez le rat, dans le cortex et l'hippocampe, après intoxication par le sarin, avec un niveau maximum à 24 h - 48 h post-exposition (Chapman et Meldrum 2006, Grauer et al. 2008). Une 2^{ème} phase d'augmentation retardée a été détectée 1 mois après l'intoxication, et persiste pendant au moins 6 mois (Grauer et al. 2008). Cette surexpression de COX-2 associée à la production durable de PGE₂, dont les effets néfastes sur le SNC viennent d'être signalés, doit être rapprochée des problématiques de morts neuronales retardées mises en évidence après intoxication par le soman (Collombet et al. 2006, Collombet et al. 2008). Des conséquences sur l'épileptogénèse sont probables.

COX-2 ne permet cependant pas une production directe de PGE₂. L'enzyme terminale aboutissant à la synthèse de la PGE₂ est la PGES, dont il existe trois isoformes : la PGES

cystosolique (cPGES), et deux isoformes membranaires : mPGES-1 et mPGES-2. L'isoforme de la PGES la plus active dans le cerveau après l'apparition de crises d'épilepsie n'étant pas connue, et les isoformes cPGES et m-PGES-2 n'étant pas inductibles, nous avons mesuré l'expression de la mPGES-1 dont l'induction couplée à celle de COX-2 a été montrée dans le SNC en cas de fièvre ou de phénomènes inflammatoires (Inoue et al. 2002, Yamagata et al. 2001). Dans notre modèle d'étude, la forte augmentation de la concentration de l'ARNm et de la protéine COX-2 laissait donc présager une augmentation parallèle des ARNm et des protéines de la mPGES-1. Nous n'avons pourtant mis en évidence qu'une faible augmentation de l'ARNm de mPGES-1 dans l'hippocampe, sans modification significative de l'ARNm dans l'ensemble du cortex. Concernant l'expression de la protéine mPGES-1, nous avons constaté un faible marquage immunohistochimique basal dans l'ensemble des structures étudiées, sans augmentation significative du marquage aux différents temps d'études. Ce résultat contraste avec la mise en évidence de l'induction de l'ARNm et de la protéine mPGES-1 dans les neurones, la microglie et les cellules endothéliales du cortex, après ischémie transitoire chez le rat (Ikeda-Matsuo et al. 2006). Cependant, dans un modèle d'EME induit chez le rat par l'administration intracérébrale d'acide kaïnique, une augmentation significative de la mPGES-1 a seulement été observée dans les cellules endothéliales, mais pas dans les neurones (Takemiya et al. 2007). La faible augmentation du taux d'ARNm dans notre modèle peut s'expliquer par le taux basal de l'ARNm de mPGES-1 déjà élevé, comme on le voit chez les animaux témoins. Le taux d'ARNm basal étant élevé, on peut imaginer que la quantité d'ARNm initiale est suffisante pour permettre une synthèse accrue de la protéine m-PGES1, sans augmentation du taux de son ARNm. Par ailleurs, l'immunomarquage de mPGES-1 chez les animaux témoins semble montrer l'expression de cette protéine à un niveau basal non négligeable même chez les animaux témoins, ce qui pourrait expliquer qu'une augmentation de sa synthèse ne soit pas indispensable à une

augmentation de la production de PGE₂. Enfin, l'intervention d'une des autres isoformes de la PGES ne doit pas être exclue. La mPGES-2 pourrait ainsi permettre la synthèse de PGE₂ puisque la mPGES-2 est exprimée de manière constitutive dans les neurones (Takemiya et al. 2007), et couplée à COX-2 (Murakami et al. 2003).

L'augmentation du taux d'ARNm de la hPGDS s'est révélée significative dans le cortex et l'hippocampe, respectivement 6 h et 48 h après l'intoxication par le soman. Cette augmentation était largement accentuée le 7^{ème} jour. Ce profil d'expression est globalement cohérent avec le marquage immunohistochimique de la hPGDS qui a été observé dans l'ensemble du cerveau, à partir de 24 h, avec une tendance à l'augmentation de l'intensité du marquage et du nombre de cellules marquées à 72 h et 7 j.

Il n'existe que peu de données concernant l'expression cérébrale de l'ARNm des PGDS dans les modèles d'épilepsie. La seule étude réalisée dans ce domaine porte sur la lPGDS (Ciceri et al. 2002). Cette étude démontre l'absence d'induction de la synthèse de l'ARNm de la lPGDS 24 h après administration systémique d'acide kaïnique chez le rat.

La morphologie des cellules exprimant la hPGDS est un paramètre intéressant à considérer de manière détaillée. En effet, avant 24 h, on distingue quelques cellules exprimant la hPGDS réparties dans l'ensemble du cerveau. Ces cellules présentent un cytoplasme de petite taille, une forme ovale, et de nombreuses et fines ramifications. Par la suite, les cellules marquées présentent un cytoplasme de taille augmentée, avec des ramifications plus longues et plus épaisses. Aux temps tardifs (72 h et 7 j), les ramifications tendent à disparaître et les cellules prennent une forme arrondie. La conformation des cellules immunomarquées, et son évolution aux différents temps d'étude, rappellent très nettement l'évolution morphologique des cellules microgliales marquées par une lectine dans nos expérimentations. En l'absence de double marquage, il n'est pas possible d'affirmer que ce sont les mêmes types cellulaires qui sont marqués par la GSA-IB4 et qui expriment simultanément la hPGDS. Cependant, des

études dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez la souris ont permis de montrer que la hPGDS est produite principalement par les cellules microgliales et les macrophages (Liu et al. 2007), qui sont eux aussi marqués par la GSA-IB4 que nous avons utilisée.

Dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez la souris, la hPGDS, productrice de la PGD₂, a montré des effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires en inhibant la production de NO, de COX-2, et en limitant l'infiltration du parenchyme cérébral par les monocytes/macrophages circulants (Liu et al. 2009). La PGD₂ possède aussi des propriétés anti-inflammatoires, notamment par une inhibition de NF-κB qui favorise la transcription de nombreux gènes de molécules pro-inflammatoires telles qu'IL-1β, TNFα, iNOS, COX-2 et ICAM-1 (Scher et Pillinger 2009). La 15d-PGJ₂, métabolite de la PGD₂, inhibe l'expression de la CXCL3/fractalkine qui joue un rôle notable dans l'infiltration du parenchyme cérébral en modulant l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales (Imaizumi et al. 2004). La PGD₂ et son métabolite sont donc susceptibles de participer activement à la résolution de la réponse inflammatoire dans le cerveau, en particulier après un EME. L'utilisation d'inhibiteurs de synthèse des PGs tels que les AINS, sélectifs ou non de COX-2, serait donc susceptible de prolonger la réponse inflammatoire observée après l'intoxication par le soman en cas d'administration pendant la phase de résolution. Comme nous l'avons expliqué dans notre introduction bibliographique, ces données peuvent être rapprochées des observations contradictoires faites lors de l'utilisation d'AINS en cas de lésions cérébrales, en particulier dans des modèles d'EME. Le moment de l'administration de l'inhibiteur semble avoir un impact majeur sur son action pro- ou antiépileptogène, ainsi que sur son action protectrice ou délétère sur les lésions cérébrales. L'inhibition de COX-2 après le début de l'EME induit par l'acide kaïnique semble avoir une action neuroprotectrice (Chen et al. 1995, Jung et al. 2006, Kawaguchi et al. 2005, Kunz et Oliw 2001), bien qu'une aggravation des processus lésionnels ait aussi été décrite dans des conditions similaires (Kim et al. 2008).

L'utilisation d'un inhibiteur de COX-2 avant le début de l'EME induit par l'acide kaïnique conduit à une aggravation des crises (Baik et al. 1999, Gobbo et O'Mara 2004, Kim et al. 2008). Des résultats non publiés obtenus antérieurement dans notre laboratoire suggèrent des différences importantes puisque dans le cas d'une intoxication par le soman, l'administration d'anti-COX-2 ne semble pas avoir d'impact sur le développement des lésions cérébrales. Dans notre modèle d'EME, il serait pertinent de mesurer l'évolution de la concentration cérébrale de PGE₂ et PGD₂ sur une durée de plusieurs semaines. De même, il serait souhaitable de préciser les effets d'un inhibiteur de la synthèse des PGs, administré à proximité ou à distance de l'EME initial, sur l'évolution de la concentration cérébrale en PGs ainsi que sur la neurotoxicité induite par le soman.

Conclusion :

L'ensemble de ces résultats montre une forte activation des différents paramètres cellulaires et moléculaires de la réponse inflammatoire centrale. Le développement de ces phénomènes neuro-inflammatoires à la suite de l'intoxication par le soman sont susceptibles d'avoir un impact sur l'aggravation des lésions cellulaires, ainsi que sur d'autres conséquences retardées de la survenue d'un EME, telles que le développement d'une épileptogénèse. La lutte contre ce phénomène peut donc représenter une voie thérapeutique. L'impact du traitement de l'EME sur la neuro-inflammation a donc constitué la base de notre seconde étude.

Étude II – Étude de l'effet neuroprotecteur et anti-inflammatoire de l'administration de 2 combinaisons d'une association atropine-kétamine chez la souris intoxiquée par une dose convulsivante de soman

I. Introduction et objectifs de l'expérimentation

Comme nous l'avons vu dans les résultats de notre première étude, l'EME consécutif à une intoxication par le soman est associée au développement de lésions irréversibles du tissu cérébral et à une réaction inflammatoire centrale.

Après 10 à 20 min de crise, les traitements classiques sont nettement moins efficaces pour prévenir le décès provoqué par l'intoxication, et pour limiter le développement des crises épileptiques et des lésions cérébrales. Au-delà de cette étroite fenêtre thérapeutique, les antagonistes du récepteur NMDA ont montré leurs propriétés anticonvulsivantes et neuroprotectrices lorsqu'ils étaient administrés jusqu'à 90 min après l'intoxication. Parmi ces composés, le MK-801, la TCP et le GK-11 se sont révélés particulièrement efficaces au laboratoire (Carpentier et al. 2001, Carpentier et al. 1994, Lallement et al. 1999, Lallement et al. 1997b, McDonough et Shih 1993, Sparenborg et al. 1993). Les deux premiers ne sont pas utilisés chez l'homme en raison de leurs effets secondaires. Le développement clinique du GK-11 n'a malheureusement pas été poursuivi en raison de son manque d'efficacité pour le traitement des traumatismes crâniens et de la moelle épinière, affections pour lesquelles il était développé. À ce jour, la kétamine (KET) est le seul anti-NMDA injectable disposant d'une AMM chez l'homme. Utilisée régulièrement (sédation, anesthésie, analgésie, épilepsie réfractaire...), généralement en combinaison avec d'autres médications, ses propriétés antiépileptiques et neuroprotectrices ont récemment été démontrées dans le cas d'intoxication par le soman (Ballough et al. 2006, Dorandeu et al. 2005, Dorandeu et al. 2007). De plus, la KET dispose de propriétés anti-inflammatoires intrinsèques mises en évidence *in vitro* et *in vivo* (DeClue et al. 2008, Kawasaki et al. 1999, Taniguchi et al. 2003).

Dans cette seconde partie, nous avons souhaité évaluer l'effet de la KET, administrée de manière retardée, sur le développement des lésions cérébrales et de la réponse inflammatoire centrale après intoxication par le soman.

Les résultats obtenus lors d'études menées chez le cobaye (Dorandeu et al. 2005, Dorandeu et al. 2007) et d'expérimentations préliminaires réalisées chez la souris, nous ont conduit à définir deux protocoles faisant appel à des administrations répétées de KET, initiées 30 min ou 60 min après l'intoxication. La KET a toujours été associée au SA, systématiquement utilisée en cas d'intoxication par le soman. Par ailleurs, le SA permet de contrer les effets dépresseurs respiratoires des anti-NMDA (McDonough et Shih 1997, McDonough et Shih 1993), particulièrement importants pour la KET chez le rongeur (Flecknell 1987). La dose de KET et la périodicité de réadministration des traitements varient selon le délai entre l'intoxication et le début du traitement.

L'essentiel des paramètres a été évalué 48 h après l'intoxication, temps d'étude pour lequel, au cours de nos premiers travaux, nous avons mis en évidence à la fois :

- des dommages cellulaires sévères
- une activation gliale majeure
- une réponse génique importante pour la plupart des médiateurs de l'inflammation étudiés.

Les objectifs de cette étude sont donc les suivants :

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. confirmer, chez la souris, les effets neuroprotecteurs de l'administration retardée de combinaisons de KET/SA après intoxication par le soman ;2. étudier leurs effets sur l'activation gliale, l'induction d'ARNm de médiateurs de l'inflammation et la synthèse des protéines correspondantes. |
|--|

II. Protocole d'étude

II.1 Modèle d'étude et protocole de traitement

Pour cette étude, un total de 154 souris ont été intoxiquées par injection sous-cutanée d'une dose de 172 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de soman (200 μl ; s.c.), précédée de 5 min par l'administration intrapéritonéale d'une oxime réactivatrice des cholinestérases périphériques (HI-6 : 50 mg/kg ; 200 μl ; i.p.) (voir p. 262).

Les animaux intoxiqués ont ensuite reçu l'un des protocoles de traitement décrits ultérieurement.

- Deux protocoles de traitement basés sur l'administration combinée de SA et de kétamine (KET), injectés séparément par voie i.p., ont été évalués :

- Protocole subanesthésique (KET25/SA) : Six administrations, espacées de 30 min, d'une combinaison de KET (25 mg/kg ; 150 μl ; i.p.) et SA (10 mg/kg ; 200 μl ; i.p.), la première injection étant réalisée 30 min après l'intoxication par le soman (Figure n° 38). Les animaux recevant ce protocole de traitement constituent le lot SOMAN/KET25/SA (n = 40).

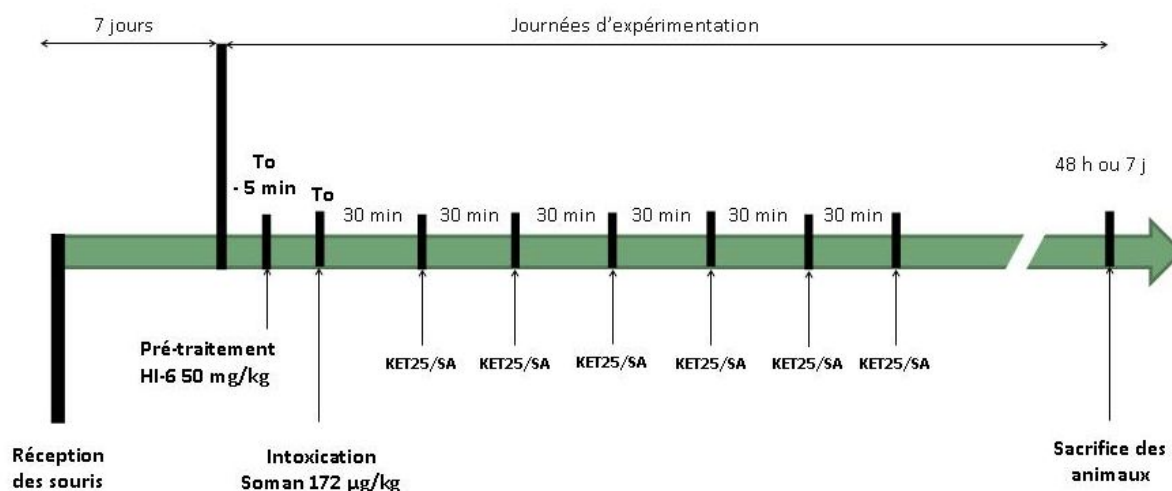


Figure n° 38 : Protocole expérimental subanesthésique (KET25/SA) appliqué au lot SOMAN/KET25/SA.

- Protocole anesthésique (KET100/SA) : Trois administrations espacées de 60 min, d'une combinaison de KET (100 mg/kg ; 60 µl ; i.p.) et SA (10 mg/kg ; 200 µl ; i.p.), la première injection étant réalisée 60 min après l'intoxication par le soman (Figure n° 39). Les animaux recevant ce protocole de traitement constituent le lot SOMAN/KET100/SA (n = 47).

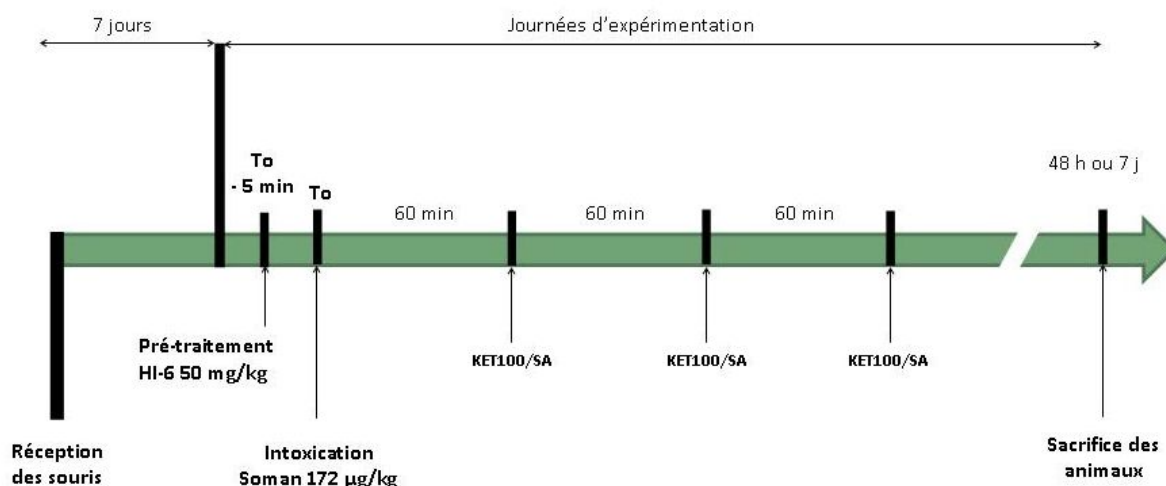


Figure n° 39 : Protocole expérimental anesthésique (KET100/SA) appliqué au lot SOMAN/KET100/SA.

- Protocoles appliqués aux lots témoins intoxiqués :

Afin d'évaluer les effets spécifiques de l'administration de la KET, les animaux témoins intoxiqués ont reçu des injections répétées de NaCl (150 µl ; i.p.) et SA (10 mg/kg ; 200 µL ; i.p.). Les injections ont débuté 30 min après l'intoxication, et ont été répétées 5 fois toutes les 30 min (TÉMOINS SOMAN 6 ; n = 41). Pour l'étude histologique, un lot supplémentaire d'animaux témoins intoxiqués a été constitué, avec des animaux recevant 3 injections de NaCl (150 µl ; i.p.) et SA (10 mg/kg ; 200 µl ; i.p.) toutes les 60 min, la première injection étant réalisée 60 min après l'intoxication (TÉMOINS SOMAN 3 ; n = 26). Nous verrons par la suite qu'en raison d'une absence de différence de réponse significative entre ces deux lots, les animaux ont été regroupés en un seul lot appelé TÉMOINS SOMAN (n = 67).

Deux lots d'animaux non intoxiqués, recevant une injection de NaCl à la place du soman, puis l'un ou l'autre des protocoles de traitement ont été constitués : TÉMOINS KET25 (n = 22) et TÉMOINS KET100 (n = 29). En absence de différence de réponse significative entre ces deux lots d'animaux témoins, les animaux ont été regroupés en un seul lot appelé TÉMOINS KÉTAMINE (n = 51).

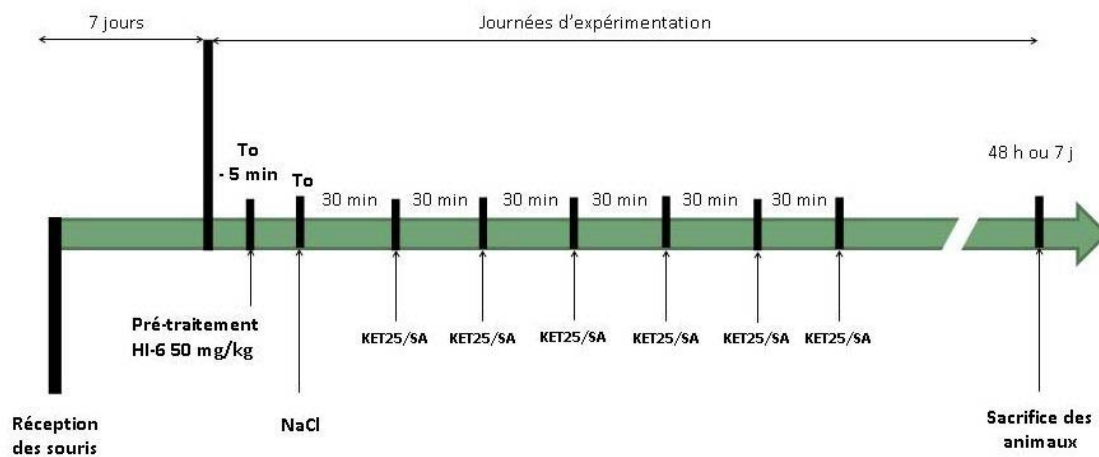


Figure n° 40 : Protocole expérimental appliqué au lot TÉMOINS KET25.

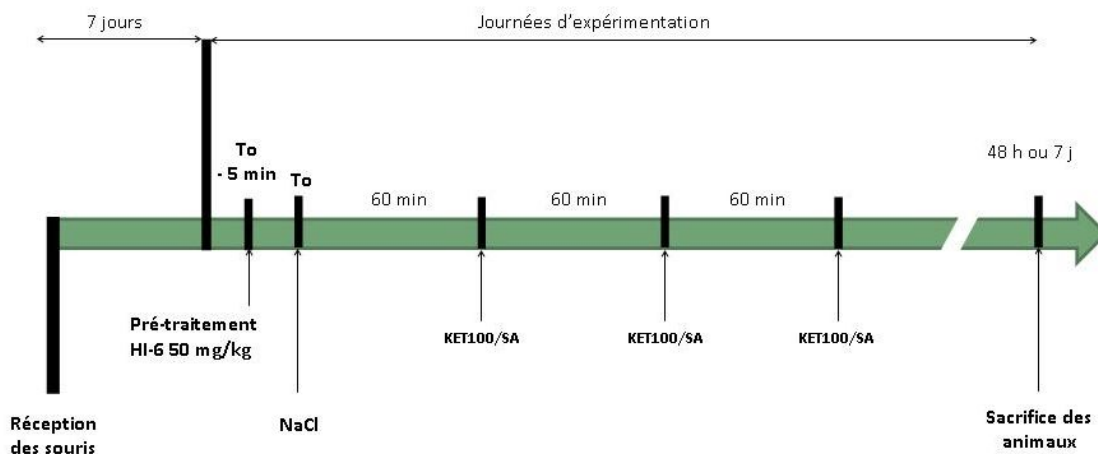


Figure n° 41 : Protocole expérimental appliqué au lot TÉMOINS KET100.

II.2 Effets généraux de l'administration de combinaisons thérapeutiques sur notre modèle d'étude : effets généraux et lésions cérébrales

Afin de caractériser les conséquences de l'administration de la KET sur notre modèle de souris intoxiquées par une dose convulsivante de soman, nous avons évalué les effets de la KET sur l'état de vigilance des animaux (niveau de sédation, narcose), sur la persistance des convulsions, sur le taux de mortalité et sur l'évolution de l'état général des animaux, en particulier l'évolution pondérale au cours des 7 j suivant l'intoxication. Le poids des animaux a été enregistré avant l'intoxication, puis à J1, J2, J3, J4, J6 et J7.

Les données concernant le délai de latence entre l'intoxication et le début des crises ont été intégrées à notre première étude.

L'effet neuroprotecteur a été apprécié en mesurant les effets de la KET sur l'intensité des lésions cérébrales. Ce paramètre a été chiffré dans différentes structures cérébrales, pour chaque animal, par une technique semi-quantitative par examen des lames colorées à l'H&P (voir p. 283 et 287). Au temps d'étude 7 j, un score lésionnel global a été attribué à chaque animal grâce à la moyenne des scores attribués dans les 5 régions présentant le maximum de lésions chez les animaux du groupe TÉMOIN SOMAN. Les résultats ont été exprimés par la moyenne \pm ES des scores individuels (Figure n° 46).

Après étude des lésions cellulaires et de l'activation gliale, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux lots TÉMOINS SOMAN 6 et TÉMOINS SOMAN 3. Les animaux ont donc été regroupés en un seul lot TÉMOINS SOMAN.

	TEMOINS KETAMINE		TEMOINS SOMAN			SOMAN/ KET25/AS	SOMAN/ KET100/AS		
	(TEMOINS KET25)	(TEMOINS KET100)	(TEMOINS SOMAN 6)	(TEMOINS SOMAN 3)					
Analyses histologiques (Tissus fixés)									
Lots									
Etude 48 h (n=)	(0)	8	(8)	(6)	11	(5)	7	2	28
Etude 7 j (n=)				(6)	15	(9)	7	5	27
Analyses effectuées									
Histologie H&P	Dommages et morts cellulaires / Oedème tissulaire								
Histochimie - Immunohistochimie	Activation / prolifération microgliale et astrocytaire - Expression de protéines spécifiques de la voie des eicosanoïdes Infiltration de polynucléaires neutrophiles								
RT-qPCR (Tissus congelés)									
Lots									
Etude 48 h (n=)	(12)	23	(11)	(7)	7	(0)	12	14	56
Analyses effectuées									
Biologie moléculaire	Quantification ARNm								
Luminex® (Tissus congelés)									
Lots									
Etude 48 h (n=)	(8)	15	(7)	(8)	8	(0)	10	10	43
Analyses effectuées									
Synthèse protéique	Mesure de la concentration de protéines médiateurs de l'inflammation								
Total	(20)	46	(26)	(27)	41	(14)	36	31	154

Figure n° 42 : Conception des études visant à évaluer les effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires de deux combinaisons KET/SA à la suite d'un EME induit par le soman.

II.3 Effets de l'administration de combinaisons thérapeutiques sur la réponse inflammatoire

II.3.1 Réponse cellulaire

Les animaux des différents lots (Figure n° 42) ont été sacrifiés 48 h ou 7 j après l'intoxication ou l'injection de sérum physiologique.

Comme dans notre première étude, les modifications cellulaires en lien avec la réponse inflammatoire ont été évaluées sur des coupes histologiques sériées. L'activation microgliale a été chiffrée pour chaque animal par une technique semi-quantitative après

marquage histochimique à la lectine GSA-IB4 (voir p. 283 et 290). L'évaluation de l'activation astrocytaire a été chiffrée pour chaque animal par une technique semi-quantitative par détection immunohistochimique de la protéine GFAP (voir p. 284 et 292).

II.3.2 Réponse moléculaire

Les animaux des différents lots (Figure n° 42) ont été sacrifiés 48 h après l'intoxication ou l'injection de sérum physiologique.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'administration de la KET sur les variations des taux relatifs d'ARNm de médiateurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires, chimiokines ou molécules d'adhésion) qui sont augmentés après l'intoxication par le soman. La quantification des ARNm a été réalisée par RT-qPCR (voir p. 268) sur les zones cérébrales prélevées (cortex et hippocampe) (voir p. 265).

Lors d'une 2^{ème} étape, nous avons mesuré la concentration des protéines correspondant aux ARNm préalablement quantifiés. Seules les modifications de la protéine SOCS3 n'ont pas été évaluées. Le dosage des différents médiateurs inflammatoires a été réalisé par la technologie Luminex[®] (voir p. 276) sur le cortex et l'hippocampe.

III. Résultats

III.1 Effet de l'administration de combinaisons thérapeutiques sur les crises d'épilepsie, l'état général, la mortalité et l'évolution de la masse corporelle

III.1.1 Observations cliniques

Chez les animaux du lot TÉMOINS KET25, l'administration de KET25/SA conduit à une perte de l'activité locomotrice et à une flaccidité musculaire entre 4 et 5 min après la 1^{ère} injection, sans narcose. De manière itérative, l'ensemble des animaux présente une reprise

progressive de ses facultés de déplacement avant chaque nouvelle injection, qui est suivie du même phénomène de perte d'activité locomotrice.

Chez les animaux du lot TÉMOINS KET100, l'administration de KET100/SA conduit à une narcose des animaux entre 3 et 6 min après la 1^{ère} injection. Environ 30 min après l'administration de KET100/SA, les animaux montrent des signes de réveil et une faible activité locomotrice accompagnée de légers tremblements. Les animaux s'endorment 2 à 3 min après la 2^{ème} injection, puis on observe le réveil des animaux avec une reprise partielle des déplacements après 30 à 45 min. Les animaux s'endorment à nouveau 2 à 3 min après la 3^e injection de KET100/SA et se réveillent 50 à 60 min plus tard.

Dans le lot TÉMOINS SOMAN, 51 animaux sur 67 ont présenté des convulsions tonico-cloniques continues, de longue durée, généralement comprises entre 4 h 30 et 5 h 30. Quinze animaux ont été exclus des analyses ultérieures car les crises convulsives, qui ont duré moins de 2 h ne nous permettaient pas d'être assurés du développement d'une encéphalopathie majeure. Après la fin des crises convulsives, les animaux de ce lot sont restés prostrés pendant environ 12 h. Ils montraient toujours un mauvais état général 7 j après l'intoxication (faible activité locomotrice, pelage mal entretenu, terne et piqué).

Dans les lots d'animaux SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA, intoxiqués par le soman, puis traités par un des protocoles définis précédemment, les convulsions tonico-cloniques disparaissent 1 à 2 min après la 1^{ère} administration de KET/SA.

Dans le lot SOMAN/KET25/SA, les animaux perdent leur activité locomotrice 1 à 2 min après chaque injection de KET25/SA et reprennent des déplacements spontanés après 20 à 25 min. Seules de légères trémulations musculaires sont détectables avant chaque nouvelle injection. Aucun signe de convulsion n'est visible après la 6^{ème} injection de KET25/SA.

Dans le lot SOMAN/KET100/SA, la narcose survient 1 à 2 min après la 1^{ère} injection de KET100/SA, suivie d'un réveil après 40 à 50 min. On constate de faibles tremblements avant la 2^{ème} injection. Par la suite, les animaux ne se réveillent généralement pas avant la 3^{ème} injection. Ils ne présentent pas de signe de convulsion à leur réveil qui débute entre 60 et 90 min après la 3^{ème} administration de KET100/SA.

Sur le plan clinique, après la fin de l'anesthésie, l'état général des animaux des lots SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA est nettement meilleur que celui des animaux du lot TÉMOINS SOMAN : activité locomotrice plus élevée, pelage mieux entretenu.

III.1.2 Mortalité

Le nombre de décès dans chaque lot figure dans le Tableau n° 8.

Dans le lot TÉMOINS KET25, les 2 animaux sont morts plus d'une heure après la 6^e injection de KET/SA, soit 9,1 % (n = 22).

Dans le lot TÉMOINS KET100, les 3 animaux sont décédés entre 20 min et 1 h après la 3^e injection de KET/S, soit 10,3 % (n = 29).

Dans le lot SOMAN/KET25/SA, aucun décès n'a été constaté soit 0 % (n = 40). Deux autres animaux sont décédés rapidement, avant le début du traitement.

Dans le lot SOMAN/KET100/SA, 1 animal est décédé après la 2^e injection, et 10 animaux sont décédés après la 3^e injection, soit 23,4 % (n = 47).

Dans le lot TÉMOINS SOMAN, 3 animaux sont décédés, soit 4,5 % (n = 67). Quatre autres animaux sont décédés rapidement, avant le début du traitement par le SA.

	TÉMOINS KETAMINE		TÉMOINS SOMAN		SOMAN/KET25/SA	SOMAN/KET100/SA
	TÉMOINS KET25	TÉMOINS KET100	TÉMOINS SOMAN 6	TÉMOINS SOMAN 3		
N Initial	51		67		40	47
	22	29	41	26		
Mortalité (n) (%)	5 (9,8%)		3 (4) (4,5%)		0 (2) (0%)	11 (23,4%)
	2 (9,1%)	3 (10,3%)	1 (2,4%)	2 (4) (7,7%)		
Exclus crises courtes	0		15		0	0
	0	0	10	5		
Retrait motif technique	0		4		2	5
	0	0	3	1		
Analysés	46		41		36	31
	20	26	27	14		

Tableau n° 8 : Tableau récapitulatif de la répartition des animaux dans les différents lots expérimentaux.
 (*) : animaux décédés avant le début du traitement.

III.1.3 Évolution de la masse corporelle

Les animaux exclus de l'analyse des résultats pour des raisons expérimentales (mauvaises fixations de l'encéphale, mise au point des conditions de dosage par la technologie Luminex®) ont été inclus dans le suivi de l'évolution de la masse corporelle.

Un jour après l'intoxication, les animaux du lot TÉMOINS SOMAN montrent une perte de poids moyenne de $17 \pm 0,7 \%$ (moyenne \pm ES ; n = 45) (Figure n° 43). Au même temps d'étude, la perte de masse corporelle des animaux est moins importante dans les lots SOMAN/KET25/SA ($10 \pm 0,8 \%$; m \pm ES ; n = 38) et SOMAN/KET100/SA ($11 \pm 0,7 \%$; m \pm ES ; n = 36).

A 7 j, les animaux des lots SOMAN/KET/25/SA et SOMAN/KET/100/SA présentent un gain de poids respectif de $5 \pm 2 \%$ (moyenne \pm ES ; n = 8) et $1 \pm 1 \%$ (moyenne \pm ES ; n = 10), alors que les animaux TÉMOINS SOMAN montrent toujours un déficit de masse corporelle de $7 \pm 2 \%$ (moyenne \pm ES ; n = 11). Considérant l'évolution de la masse corporelle durant les deux premiers jours, ou durant les 7 jours d'expérimentation, le déficit

pondéral est statistiquement moins important dans les lots SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA que dans le lot TÉMOINS SOMAN à 48 h ($\alpha < 0,001$) et à 7 j ($\alpha < 0,01$) (Figure n° 43).

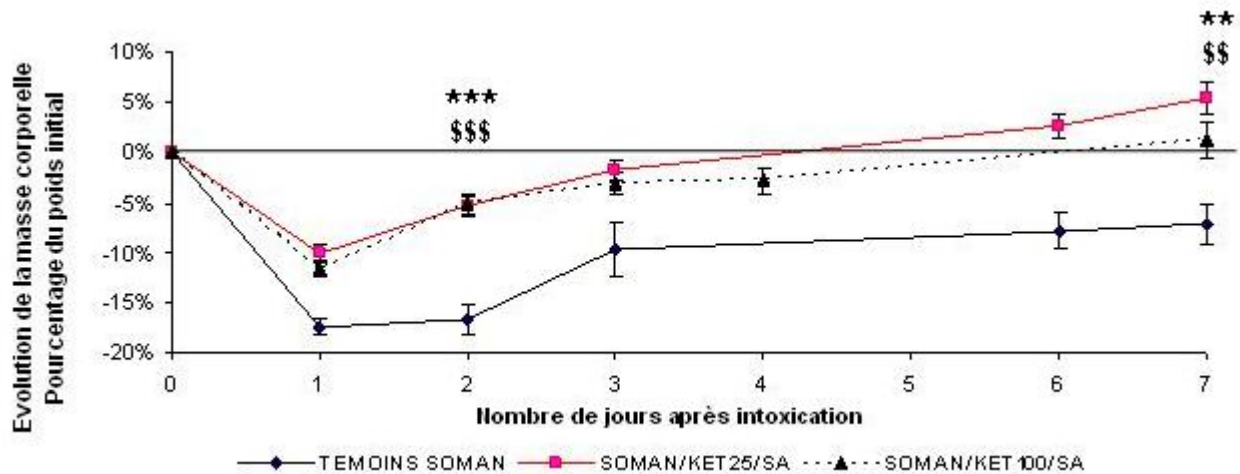


Figure n° 43 : Évolution de la perte de masse corporelle dans les lots traités avec une combinaison KET/SA : SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA, en comparaison avec le lot TÉMOINS SOMAN. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de perte de poids \pm ES. Le lot TÉMOINS SOMAN a été comparé successivement aux lots SOMAN/KET25/SA (*) et SOMAN/KET100/SA (\$) par comparaison des aires sous la courbe du suivi de la masse corporelle pendant 48 h et 7 j. (*,\$) $\alpha < 0,05$; (**,\$\$) $\alpha < 0,01$; (***,\$\$\$) $\alpha < 0,001$. Pour les temps d'études 1, 2, 3, 4, 6 et 7 jours, le nombre d'animaux dans chaque lot est respectivement : SOMAN/KET25/SA : n = 38, 38, 38, 0, 8 et 8 ; SOMAN/KET100/SA : n=36, 36, 10, 10, 0 et 10 ; TÉMOINS SOMAN : n = 45, 45, 15, 4, 11 et 15.

III.2 Effets de l'administration de combinaisons thérapeutiques sur les lésions cérébrales induites par le soman

- Étude 48 h après l'intoxication

Chez les animaux TÉMOINS KÉTAMINE, aucune lésion cellulaire n'est mise en évidence par la coloration H&P (Figure n° 44).

Dans le lot TÉMOINS SOMAN, des dommages cellulaires sont mis en évidence par la présence de nombreuses cellules éosinophiles et un œdème cellulaire donnant un aspect spongieux dans les zones d'intérêt (Figure n° 44). Tous les animaux montrent des lésions dans le septum latéral, le cortex piriforme et l'amygdale. Alors que 9 animaux sur 11 présentent de fortes lésions de l'hippocampe, 2 souris ne montrent aucun dommage cellulaire dans cette

structure. Le striatum et le thalamus apparaissent moins fréquemment lésés puisque respectivement 5 et 8 animaux parmi 11 ne présentent pas de lésions de ces structures.

Dans le lot SOMAN/KET25/SA, la gravité des lésions cellulaires est considérablement réduite par comparaison avec le lot TÉMOINS SOMAN (Figure n° 44 et Figure n° 45). Seules quelques cellules éosinophiles sont mises en évidence par coloration H&P dans le septum latéral et l'amygdale. Le cortex piriforme, le striatum, le thalamus, les couches CA1 et CA3 de l'hippocampe ne présentent pas de dommage cellulaire visible, ni de signe d'œdème. Dans le lot SOMAN/KET100/SA, seules quelques cellules éosinophiles sont observées dans le septum latéral chez un seul des deux animaux survivants.

- Étude 7 jours après l'intoxication

Dans le lot TÉMOINS SOMAN, des cellules éosinophiles et des zones de pertes cellulaires sont détectables dans l'ensemble des structures étudiées, à l'exception du striatum et du thalamus. Dans le lot SOMAN/KET25/SA, aucune cellule éosinophile n'est mise en évidence par la coloration H&P dans l'ensemble des structures étudiées. On ne distingue pas de zones de pertes cellulaires (Figure n° 46, Figure n° 47). Dans le lot SOMAN/KET100/SA, seules quelques cellules éosinophiles (score lésionnel éosinophile =1) sont détectées chez 2 animaux sur 5, dans le septum latéral et chez un seul animal dans l'amygdale. Aucune cellule éosinophile n'est visible dans les autres zones cérébrales.

III.3 Effets de l'administration de combinaisons thérapeutiques sur les modifications cellulaires de la réponse inflammatoire induites par le soman

- Étude 48 h après l'intoxication

Chez les animaux TÉMOINS KÉTAMINE, l'activation microgliale et astrocytaire reste comparable à celle observée chez les animaux naïfs (Figure n° 44).

Dans le lot TÉMOINS SOMAN, une importante activation microgliale, mise en évidence par la présence de cellules activées ou amiboïdes, est détectée chez tous les animaux dans le septum latéral, le cortex piriforme et l'amygdale. Dans l'hippocampe, l'activation microgliale est importante chez tous les animaux, à l'exception d'un animal qui ne présente pas de lésion cellulaire dans l'aire CA1. Dans le thalamus et le striatum, comme pour les lésions neuronales, l'activation microgliale est plus faible que dans les autres structures (résultats non présentés).

Une activation astrocytaire importante est détectée dans le septum latéral et l'amygdale chez tous les animaux. Dans la zone CA1, l'activation astrocytaire est notable chez tous les animaux, à l'exception d'un individu qui ne présente pas de lésions cellulaires dans cette structure. Dans le cortex piriforme et l'aire CA3, le niveau d'expression de GFAP n'est pas aussi élevé que dans les autres régions observées. Dans le thalamus et le striatum, comme pour les lésions neuronales et l'activation microgliale, le marquage astrocytaire est plus faible que dans les autres structures (résultats non présentés).

L'infiltration du parenchyme cérébral par les GNN est détectée dans le cortex piriforme, l'amygdale, la zone CA1 et la zone CA3 chez respectivement 2, 4, 1 et 8 animaux sur 11.

Le nombre d'animaux présentant une activation microgliale et astrocytaire, ainsi que l'intensité de ces activations, sont plus faibles dans les lots SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA (Figure n° 44 et Figure n° 45) que dans le lot TÉMOINS SOMAN. Bien que l'activation gliale semble être diminuée par l'administration de l'un ou l'autre des protocoles de traitement, ce phénomène n'est pas toujours statistiquement significatif, en particulier pour le marquage de la protéine GFAP. En effet, dans les deux lots SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA, une activation gliale se développe dans les

zones dans lesquelles l'administration de KET/SA diminue ou empêche totalement le développement de lésions cellulaires. La présence de GNN n'est jamais détectée dans les lots d'animaux traités.

- Étude 7 jours après l'intoxication

L'activation microgliale n'a pas pu être évaluée dans le lot TÉMOINS SOMAN. En effet, comme nous l'avons observé lors de notre première étude, le marquage par la GSA-IB4 prend un aspect « diffus » 7 j après l'intoxication, ce qui ne permet pas de distinguer les cellules microgliales de manière satisfaisante (Figure n° 47). Cependant, dans le lot SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA, le marquage par la GSA-IB4 permet d'observer des cellules gliales qui sont toutes à l'état quiescent, ce qui traduit un retour à la normale du niveau d'activation.

Dans le lot TÉMOINS SOMAN, une forte activation astrocytaire, déjà mise en évidence lors de notre première étude, est observée dans l'ensemble des structures examinées. Dans le lot SOMAN/KET25/SA, seule une très faible activation astrocytaire est détectée, uniquement dans le cortex piriforme et l'amygdale, chez 3 animaux sur 7. Dans le lot SOMAN/KET100/SA, seuls 2 animaux sur 5 présentent une très faible activation astrocytaire dans le septum latéral et l'amygdale, ainsi que dans l'aire CA1 pour 1 animal sur 5.

A 7 j, la présence de GNN n'est jamais détectée dans aucun des lots expérimentaux.

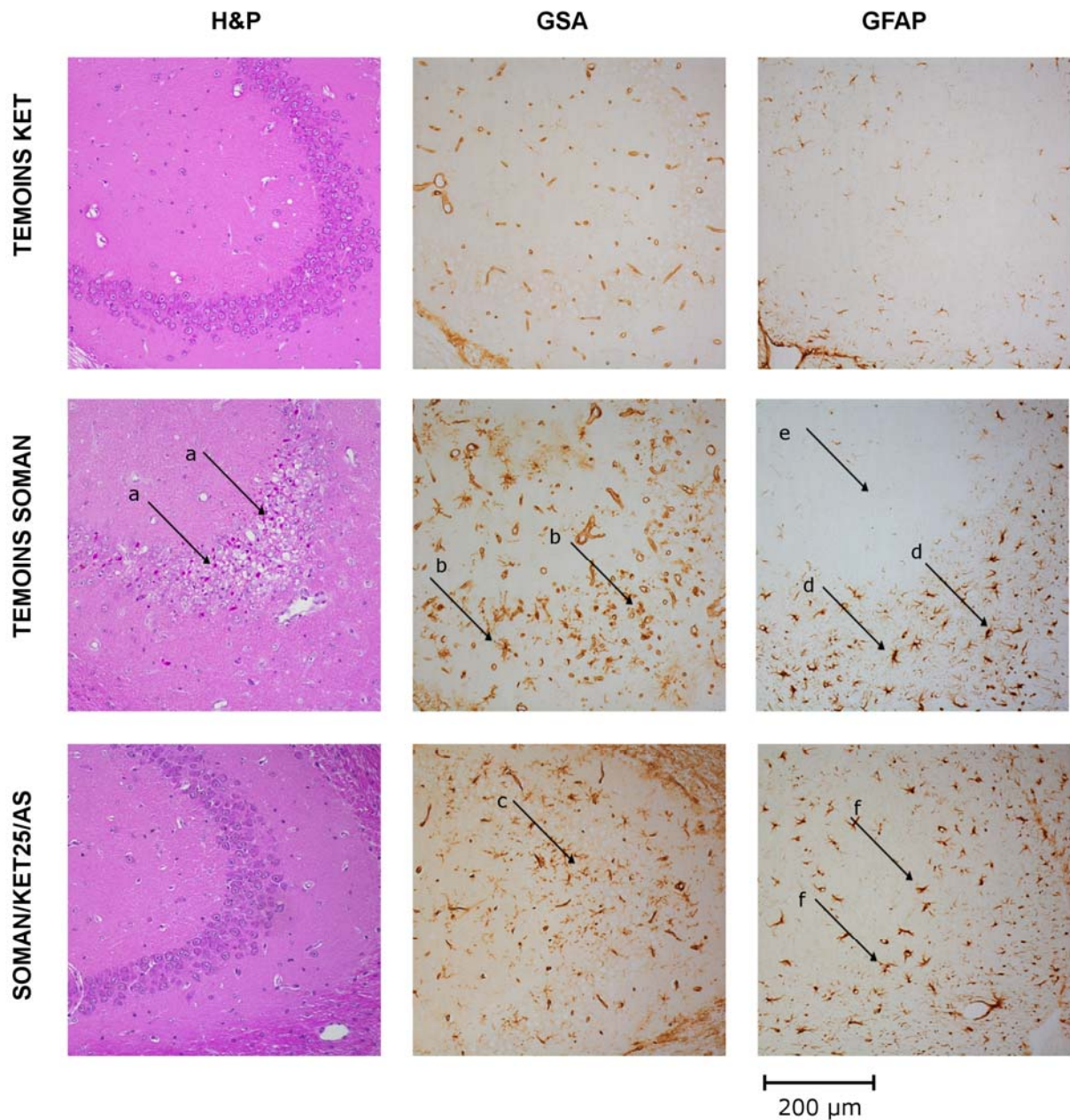


Figure n° 44 : Modifications histologiques (H&P) et immunohistochimiques (GSA et GFAP) dans la région CA3 de l'hippocampe 48 h après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μg/kg ; s.c.) et incidence de l'administration d'une combinaison KET/SA. a : cellules éosinophiles ; b : cellules microgliales amiboïdes ; c : cellules microgliales hyper-ramifiées ; d et f : astrocytes activés ; e : absence de marquage GFAP dans la région des cellules pyramidales de l'aire CA3.

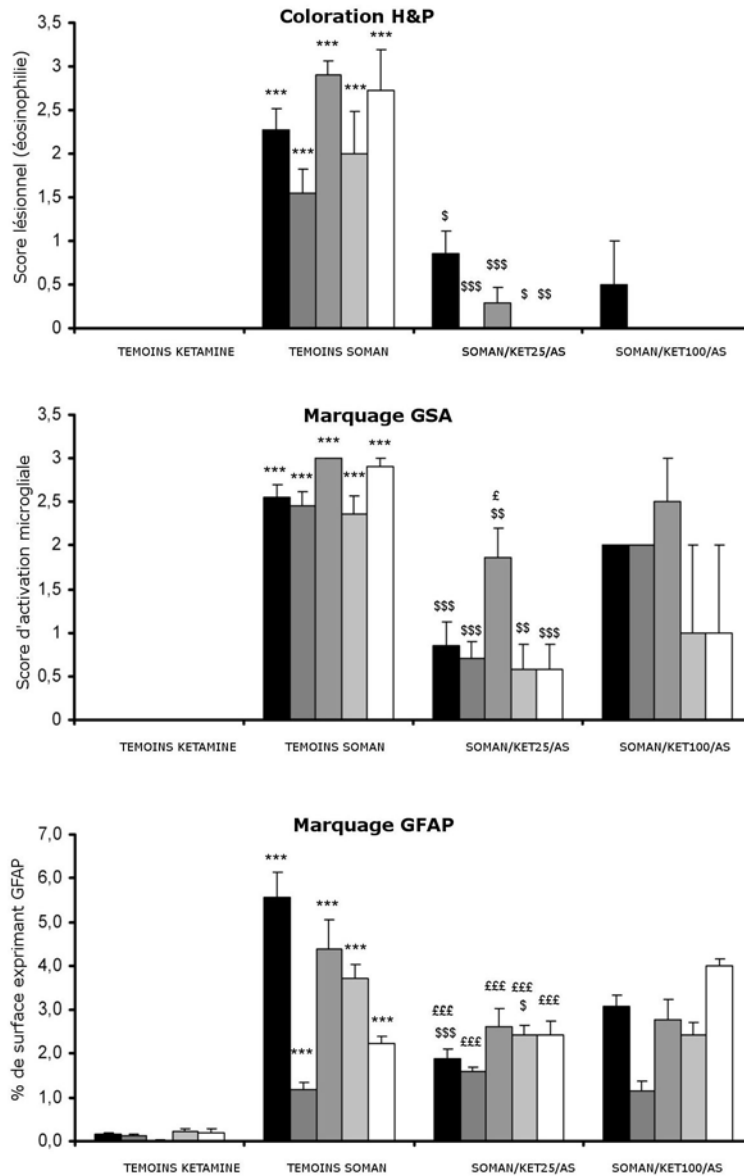


Figure n° 45 : Évaluation des lésions cellulaires, de l'activation microgliale et de l'activation astrocytaire 48 h après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.), et de leurs modifications induites par l'administration des combinaisons KET25/SA ou KET100/SA.

Les évaluations des lésions cellulaires, de l'activation microgliale et astrocytaire, ont été réalisées respectivement par marquage histologique H&P, par histochimie (GSA) et immunohistochimie (GFAP) (Voir p. 287 - 292). Les structures étudiées sont le septum latéral (■), le cortex piriforme (▣), l'amygdale (▤), la région CA1 de l'hippocampe (▥) et la région CA3 de l'hippocampe (□). Les comparaisons ont été réalisées entre le lot TÉMOINS SOMAN et le lot TÉMOINS KET (*). Le lot SOMAN/KET25/SA a été comparé au lot TÉMOINS SOMAN (\$), ou au lot TÉMOINS KÉTAMINE (£). (*,\$,£) $\alpha < 0,05$ (**,\$\$,££) $\alpha < 0,01$ (***,\$\$\$,£££) $\alpha < 0,001$. Le lot SOMAN/KET100/SA n'a pas été comparé aux autres lots en raison du faible nombre d'animaux survivants (n = 2). Les effectifs des lots TÉMOINS KÉTAMINE, TÉMOINS SOMAN et SOMAN/KET25/SA sont respectivement : n = 8, 11 et 7.

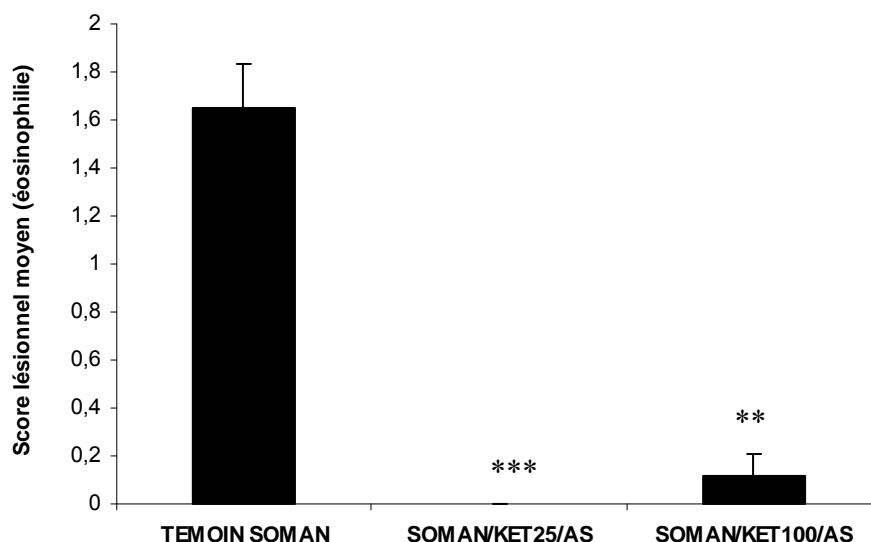


Figure n° 46 : Évaluation des dommages cellulaires observés à 7 j dans les lots TÉMOINS SOMAN, SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA

Un score lésionnel global est attribué à chaque animal grâce à la moyenne des scores attribués dans les 5 régions étudiées (septum latéral, cortex piriforme, amygdale, CA1 et CA3). Les résultats ont été exprimés par la moyenne \pm ES des scores individuels. Pour les lots TÉMOINS SOMAN, SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA : n = 15, 7 et 5. Le lot TÉMOINS SOMAN a été comparé successivement aux lots SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA. (**) $\alpha < 0,01$; (***) $\alpha < 0,001$.

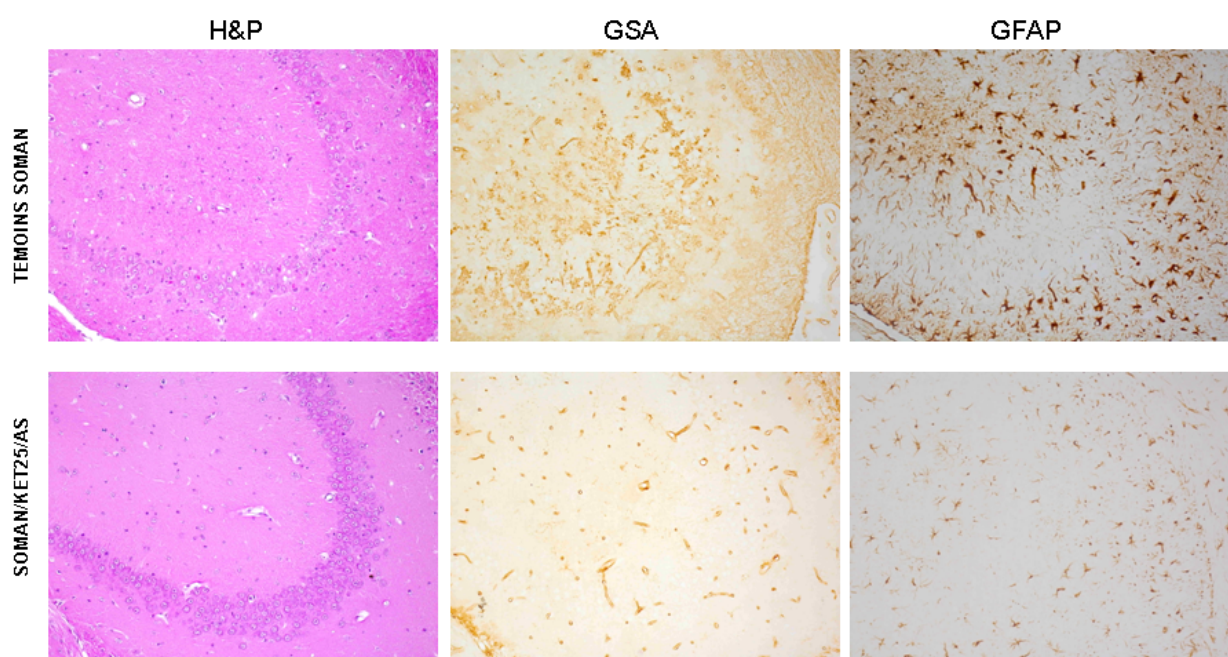


Figure n° 47 : Modifications histologiques (H&P) et immunohistochimiques (GSA et GFAP) dans la région CA3 de l'hippocampe 7 j après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg ; s.c.) et incidence de l'administration d'une combinaison KET/SA.

Absence de cellules éosinophiles, microglie quiescente et expression basale de la protéine GFAP chez les animaux traités par une combinaison KET25/AS.

III.4 Effet de l'administration de combinaisons thérapeutiques sur l'ARNm et les protéines de médiateurs de l'inflammation 48 h après intoxication par le soman

L'étude des taux relatifs des différents ARNm mesurés, ainsi que l'étude des concentrations en protéines correspondantes, n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les lots TÉMOINS KET25 et TÉMOINS KET100. Ces deux lots ont donc pu être regroupés en un seul lot TÉMOINS KÉTAMINE.

- Étude des variations de taux d'ARNm

Chez les animaux du lot TÉMOINS SOMAN, le taux relatif d'ARNm des gènes étudiés est significativement augmenté par comparaison avec le lot TÉMOINS KÉTAMINE, à l'exception de VCAM-1 dans le cortex (Figure n° 48, Figure n° 49 et Figure n° 50).

Dans les deux structures étudiées, le traitement KET/SA permet généralement de limiter l'augmentation du taux relatif des ARNm causée par le soman, de manière statistiquement significative. Ce phénomène est particulièrement marqué pour les ARNm de SOCS3, IL-6 et TNF α , aussi bien dans le cortex que dans l'hippocampe (Figure n° 48 et Figure n° 49). Il faut cependant noter que les taux d'ARNm des lots SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA ne retrouvent pas les valeurs basales observées chez le lot TÉMOINS KÉTAMINE.

- Étude des variations de concentration de protéines de l'inflammation

Dans le lot TÉMOINS SOMAN, l'augmentation du taux relatif des ARNm est généralement accompagnée d'une élévation de la concentration des protéines correspondantes (Figure n° 49 et Figure n° 50). Les seules exceptions concernent l'augmentation de la concentration de TNF α et d'IL-6, peu importante et non significative dans le cortex (Figure n° 49). De même, aucune modification significative de la concentration de VCAM-1 n'est mise en évidence dans les deux structures étudiées (Figure n° 50).

Les deux protocoles testés KET25/SA et KET100/SA ont des effets similaires sur la limitation de l'augmentation du taux relatif des ARNm et de la concentration des protéines correspondantes. Seules les concentrations des protéines IL-6 et CCL5 (dans le cortex), ainsi que TNF α et VCAM-1 (dans les deux structures étudiées) ne semblent pas modifiées par les traitements administrés (Figure n° 49 et Figure n° 50). Le taux des protéines mesurées ne revient cependant que rarement à un taux similaire au lot TÉMOINS KÉTAMINE.

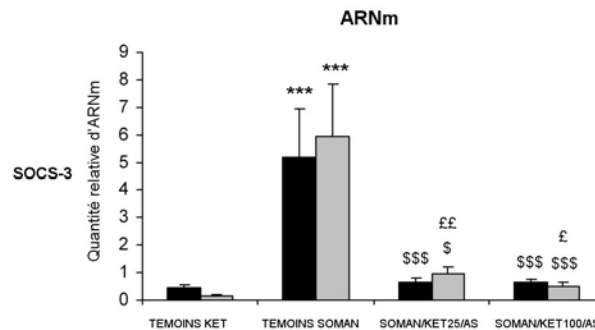


Figure n° 48 : Analyse par RT-qPCR quantitative dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de l'évolution de l'expression de l'ARNm de SOCS3 induite par une dose convulsivante de soman (172 μ g/kg) et des modifications après traitement par une combinaison KET/SA.

Deux protocoles KET/SA ont été testés. Pour chaque lot, le résultat (moyenne \pm ES) représente le taux d'ARNm du gène cible rapporté au taux d'ARNm d'une combinaison de gènes de référence. Les comparaisons ont été réalisées entre le lot TÉMOINS SOMAN et le lot TÉMOINS KET (*). Chaque lot SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA a été comparé au lot TÉMOINS SOMAN (\$), ou au lot TÉMOINS KÉTAMINE (£). (*,\$,£) $\alpha < 0,05$ (**,\$\$,££) $\alpha < 0,01$ (***,\$\$\$,£££) $\alpha < 0,001$.

Les effectifs des lots TÉMOINS KÉTAMINE, TÉMOINS SOMAN, SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA sont respectivement : n = 23, 7, 12 et 14.

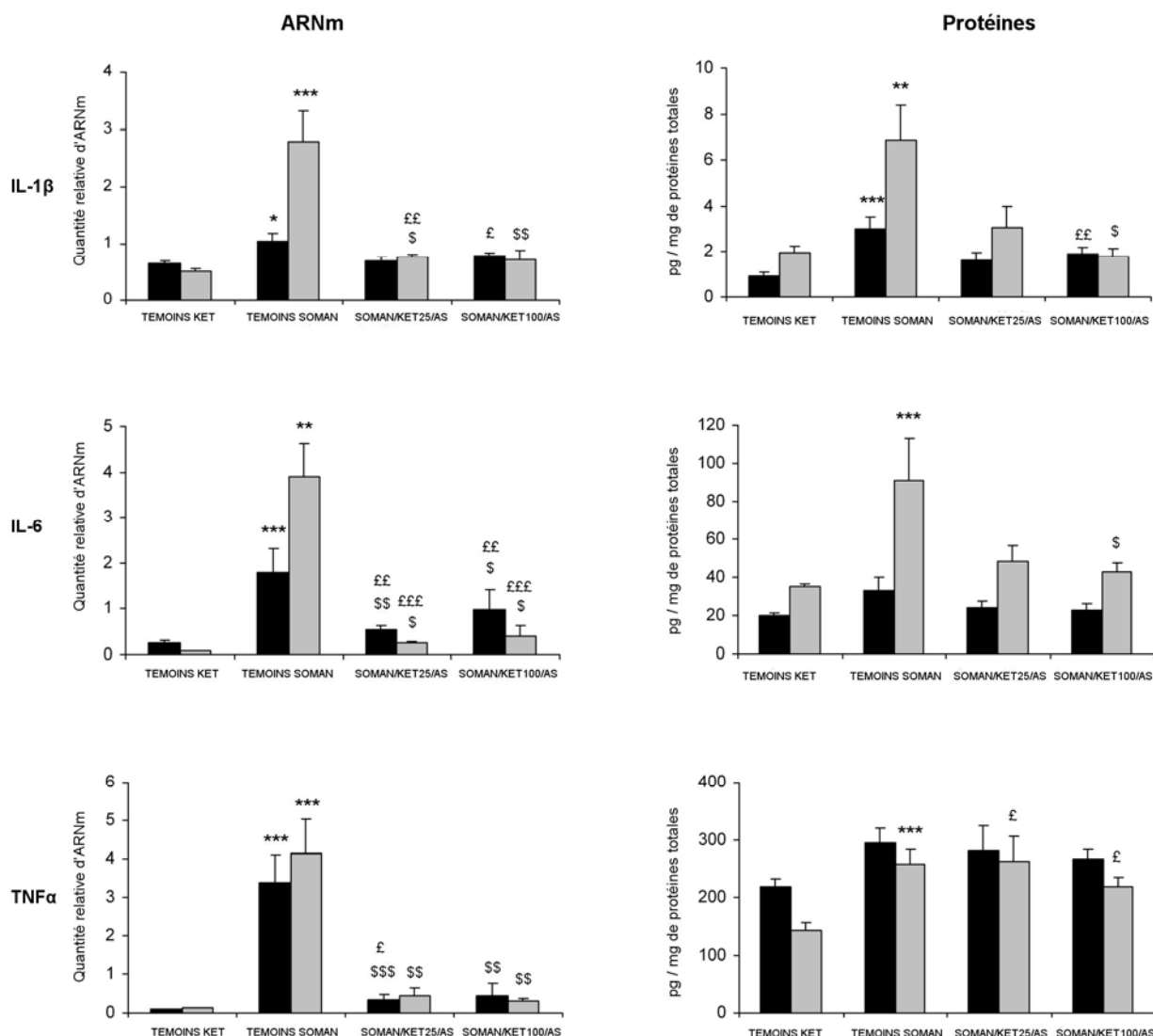


Figure n° 49 : Analyse par RT-qPCR quantitative et par analyses multiplexées (technologie Luminex™), dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de l'évolution de l'expression de l'ARNm de cytokines pro-inflammatoires et des protéines correspondantes induites par l'intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg) et de leurs modifications après traitement par deux combinaison KET/SA.

Deux protocoles KET/SA ont été testés. Pour chaque lot, le résultat représente la moyenne ± ES. Le taux d'ARNm du gène cible a été rapporté au taux d'ARNm d'une combinaison de gènes de référence. Les comparaisons ont été réalisées entre le lot TÉMOINS SOMAN et le lot TÉMOINS KET (*). Chaque lot SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA a été comparé au lot TÉMOINS SOMAN (\$), ou au lot TÉMOINS KÉTAMINE (£). (*,\$,£) $\alpha < 0,05$ (**,\$\$,££) $\alpha < 0,01$ (***,\$\$\$,£££) $\alpha < 0,001$.

Les effectifs des lots TÉMOINS KÉTAMINE, TÉMOINS SOMAN, SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA sont respectivement : n = 23, 7, 12 et 14 pour l'étude de quantification des ARNm et n = 15, 8, 10 et 10 pour l'étude de dosage des protéines.

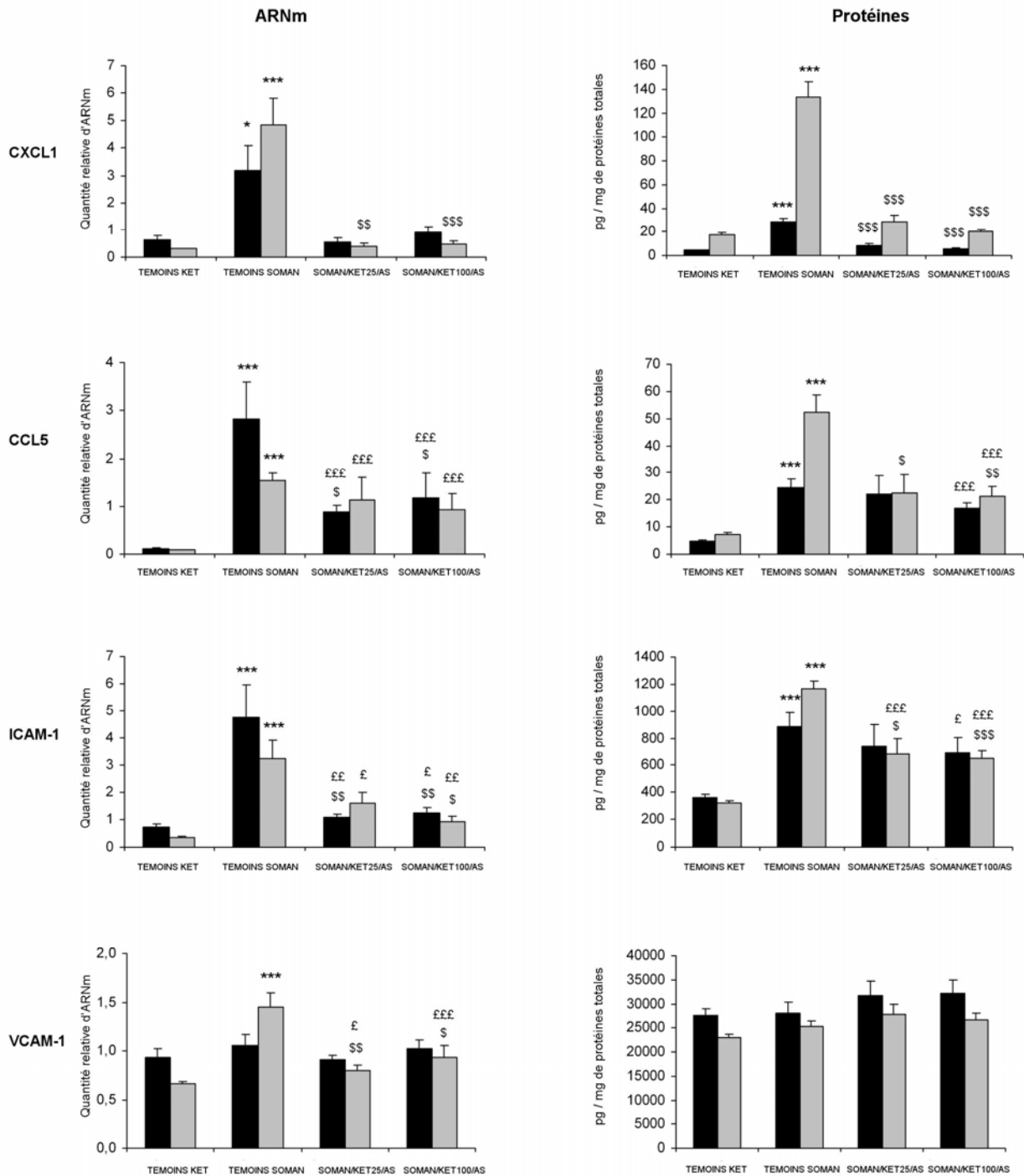


Figure n° 50 : Analyse par RT-qPCR quantitative et par analyses multiplexées (technologie Luminex™), dans le cortex (■) et dans l'hippocampe (■) de l'évolution de l'expression de l'ARNm de chimiokines, de molécules d'adhésion et des protéines correspondantes induites par l'intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.) et de leurs modifications après traitement par deux combinaisons KET/SA.

Deux protocoles KET/SA ont été testés. Pour chaque lot, le résultat représente la moyenne ± ES. Le taux d'ARNm du gène cible a été rapporté au taux d'ARNm d'une combinaison de gènes de référence. Les comparaisons ont été réalisées entre le lot TÉMOINS SOMAN et le lot TÉMOINS KET (*). Chaque lot SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA a été comparé au lot TÉMOINS SOMAN (\$), ou au lot TÉMOINS KÉTAMINE (£). (*,\$,£) $\alpha < 0,05$ (**,\$\$,££) $\alpha < 0,01$ (***,\$\$\$,£££) $\alpha < 0,001$. Les effectifs des lots TÉMOINS KÉTAMINE, TÉMOINS SOMAN, SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA sont respectivement : n = 23, 7, 12 et 14 pour l'étude de quantification des ARNm et n = 15, 8, 10 et 10 pour l'étude de dosage des protéines.

IV. Éléments de discussion

Dans cette seconde partie, les résultats obtenus chez les animaux témoins intoxiqués ont permis de confirmer l'ampleur de la réaction neuro-inflammatoire induite par le soman révélée lors de notre première étude, malgré l'administration répétée de SA après l'intoxication.

En outre, nous avons confirmé l'effet neuroprotecteur de la combinaison KET/SA, après intoxication par le soman, même en cas d'administration retardée.

Enfin, nous avons montré que l'administration d'une combinaison KET/SA limite l'activation gliale ainsi que les composantes génique et protéique de la production de médiateurs de l'inflammation dans le cerveau.

IV.1 Médiateurs de l'inflammation chez les animaux intoxiqués : évolution des taux relatifs d'ARNm et de la concentration des protéines correspondantes

L'augmentation du taux relatif des ARNm des différents médiateurs de l'inflammation, mesurée 48 h après l'intoxication par le soman, est cohérente avec les résultats de notre première étude mettant en évidence une augmentation précoce et durable du taux relatif des ARNm de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhésion. Les gènes étudiés étant fortement inductibles, on peut supposer que l'augmentation du taux relatif des ARNm est essentiellement liée à une augmentation de leur synthèse.

L'augmentation du taux relatif des ARNm se traduit par une augmentation de la concentration en protéines pour la majorité des gènes étudiés (IL-1 β , ICAM-1, CXCL1, CCL5). Ce résultat suggère que, dans nos conditions expérimentales, la survenue des crises épileptiques n'a pas fortement perturbé le phénomène de traduction des ARNm en protéines, contrairement à ce qui avait été montré par d'autres auteurs dans d'autres modèles de crises

d'épilepsie (Carnevali et al. 2006, Wasterlain 1974). Cependant, le niveau d'augmentation de la synthèse des protéines recherchées ne reflète pas toujours l'augmentation du taux des ARNm correspondants. Ce phénomène est particulièrement visible dans le cas de l'IL-6 et du TNF α dans le cortex. Le découplage entre les niveaux d'ARNm et des protéines associées serait dû à l'existence de multiples mécanismes de régulation post-transcriptionnels et traductionnels des ARNm. Ces phénomènes ont été précédemment mis en évidence pour le TNF α (Carvalho et al. 2000, Figiel et Dzwonek 2007, Lee et al. 1994, Sairanen et al. 2001).

L'absence d'augmentation de la concentration de la protéine VCAM-1 est cohérente avec les résultats de notre première étude montrant que le taux relatif de l'ARNm de VCAM-1 est soit inchangé (cortex), soit seulement légèrement augmenté (hippocampe) 48 h après l'intoxication.

La concentration des protéines recherchées est généralement plus importante dans l'hippocampe que dans l'ensemble du cortex. Ceci peut s'expliquer par le niveau de lésions cellulaires plus important et plus homogène dans l'hippocampe, en comparaison avec le cortex, composé d'un ensemble de structures moins uniformément lésées.

IV.2 Effets de l'administration des différentes combinaisons KET/SA chez les animaux intoxiqués

IV.2.1 Effets de l'administration répétée de KET/SA sur les convulsions et la narcose

L'intoxication a une incidence à la fois sur le délai d'endormissement, et sur la durée de la narcose provoquée par l'administration de KET/AS. En effet, le délai d'endormissement après la première administration de KET100/AS est plus court chez les animaux intoxiqués (1 à 2 min) que chez les animaux témoins (3 à 6 min). Par ailleurs, la durée de la narcose est plus élevée chez les animaux intoxiqués que chez les animaux témoins : les animaux témoins se réveillent respectivement environ 30, 40 et 50 min après chaque injection de KET100/AS ;

chez les animaux intoxiqués, le réveil n'apparaît que 40 à 50 min après la première injection de KET100AS, et ils ne se réveillent généralement que 60 à 90 min après la 3^e injection. L'endormissement plus rapide et la durée de narcose augmentés chez les animaux intoxiqués peut s'expliquer par la détresse physiologique induite par l'EME, conduisant à une plus grande sensibilité vis-à-vis de l'effet sédatif de la KET. Une modification de sa pharmacodynamie, et donc de sa concentration tissulaire pourrait aussi expliquer sa plus longue durée d'action. Enfin, l'allongement progressif de la durée de réveil chez les animaux témoins après administration de KET100/AS s'explique par l'accumulation progressive de la KET qui n'est pas encore totalement éliminée lors de la nouvelle administration qui a lieu après un délai de 60 min.

IV.2.2 Effets de l'administration répétée de KET/SA les convulsions, la narcose et la mortalité

Suite à des résultats obtenus chez le cobaye (Dorandeu et al. 2005, Dorandeu et al. 2007) et à des études préliminaires sur la souris, nous avons choisi de mettre en œuvre des protocoles incluant des administrations répétées de KET/SA afin de maximiser les effets neuroprotecteurs potentiels de la KET malgré les risques de toxicité par surdosage.

Les résultats de cette étude confirment l'efficacité de la KET pour prévenir la mortalité après intoxication par le soman puisque le taux de mortalité de 0 % mis en évidence chez le cobaye (n = 5) (Dorandeu et al. 2005) après administration retardée (Soman + 30 min) d'une combinaison KET/AS à dose subanesthésique, est retrouvés dans notre modèle (n = 40). Cet effet sur la mortalité est cependant moins flagrant que ce qui été observé lors de l'utilisation d'une combinaison KET/AS chez le cobaye chez qui la mortalité des animaux du lot TÉMOINS SOMAN était de 93 % (n = 16) (Dorandeu et al. 2005) alors qu'elle n'est que de (4,5 %) (n = 67) dans notre étude.

La surmortalité observée lors de l'application du protocole anesthésique peut s'expliquer par la forte dose utilisée et par l'accumulation progressive de la KET insuffisamment métabolisée, alors que la molécule est ré-administrée pour la 2^{ème} ou 3^{ème} fois, aboutissant à un surdosage. En effet, les décès d'animaux intoxiqués recevant ce protocole anesthésique surviennent après la 2^{ème} ou la 3^{ème} injection, réalisées alors que les animaux présentent des signes de sédation importants (avant la 2^{ème} injection), ou sont encore dans un état de narcose (avant la 3^{ème} injection). Afin d'optimiser ce protocole thérapeutique mis en œuvre lorsque le traitement est initié 60 min après l'intoxication, et pour limiter le nombre de décès dus à un surdosage de KET, il serait souhaitable de réduire la dose administrée (ex : 75 mg/kg pour la première dose, suivie de 2 doses de 50 mg/kg, dont l'administration est réalisée toutes les heures), ou d'espacer les injections de KET100/SA en ne réalisant la 2^{ème} ou la 3^{ème} injection que lorsque les animaux montrent des signes de réveil suffisants. Ces protocoles, en cours de test dans notre laboratoire, montrent effectivement de meilleurs taux de survie.

IV.2.3 Effets neuroprotecteurs de l'administration répétée de KET/SA

Aucune lésion cellulaire n'est détectée par la coloration H&P chez les animaux du lot TEMOINS KETAMINE. Nous ne mettons ainsi pas en évidence de propriétés neurotoxiques de la KET dans nos conditions expérimentales. En particulier, nous n'avons pas repéré de modifications vacuolaires comparables à celles décrites dans les neurones du cortex cingulaire et dans le cortex rétrosplénial après administration de KET chez le rat. Cependant, notre temps d'étude (48 h) est probablement trop éloigné de l'administration pour permettre la détection de ce type de modifications cellulaires. En effet, elles sont décrites dans les premières heures après l'injection de KET, et deviennent difficilement détectables au-delà de 5 h (Jevtovic-Todorovic et Carter 2005).

Dans le lot TÉMOINS SOMAN, l'administration répétée de SA ne permet pas d'empêcher la survenue des signes cliniques de convulsions, ni les effets généraux de l'intoxication par le soman, même lorsque le SA est réadministré à cinq reprises toutes les 30 min, en commençant 30 min après l'intoxication. Cependant, parmi ces animaux témoins intoxiqués, certains animaux (15/67) développent des crises de courte durée. Chez les animaux développant des crises de longue durée, 2, 5 et 8 animaux sur 11 ne présentent respectivement aucune lésion dans l'hippocampe, le thalamus et le striatum 48 h après l'intoxication. Ces éléments diffèrent des résultats obtenus dans notre première étude. La réduction de la durée des crises et la réduction de la fréquence des lésions dans certaines zones cérébrales pourraient être mises en relation avec l'administration importante et répétée de SA. La différence de réactivité de l'hippocampe, en comparaison avec d'autres structures cérébrales étudiées, a déjà été rapportée dans d'autres modèles (Aroniadou-Anderjaska et al. 2009, Carpentier et al. 2000). L'hippocampe est à la fois une structure généralement moins endommagée que les autres structures lors de l'intoxication par le soman (Aroniadou-Anderjaska et al. 2009, Shih et al. 2003), mais c'est aussi une structure dans laquelle le développement des lésions pourrait être plus facilement interrompu après la mise en place des crises d'épilepsie (Carpentier et al. 2000). A notre connaissance, cette protection du thalamus et du striatum par l'administration de doses importantes et répétées de SA n'a pas été rapportée après intoxication par le soman chez la souris. Elle pourrait s'expliquer par une différence de réactivité de ces structures, comme cela a été évoqué pour l'hippocampe.

Les protocoles KET25/SA et KET100/SA conduisent à une limitation de la perte de poids initiale observée 24 h après l'intoxication, et permet d'améliorer la reprise de masse corporelle au cours des 7 j suivants. Cette simple observation permet de supposer un effet favorable des deux protocoles testés en termes de neuroprotection. En effet, il a été montré que l'importance de la perte de masse corporelle initiale, ainsi que le maintien d'un déficit

pondéral pendant les jours suivant l'intoxication, étaient des facteurs prédictifs fiables de la sévérité des lésions cérébrales (Churchill et al. 1985, Filliat et al. 2007). Ils peuvent ainsi constituer un paramètre utile pour l'évaluation globale de l'efficacité des traitements utilisés des animaux intoxiqués (Dorandeu et al. 2007).

En comparant le niveau des lésions cellulaires des animaux du lot TÉMOINS SOMAN aux résultats des lots SOMAN/KET25/SA et SOMAN/KET100/SA, nous avons pu attribuer les effets bénéfiques de la combinaison KET/SA à la présence supplémentaire de KET dans les différents protocoles testés. La KET permet de lutter contre les conséquences de la libération massive de glutamate qui favorise l'auto-entretien de l'EME et produit des effets dévastateurs sur l'intégrité cellulaire de différentes zones cérébrales. Cette activité anticonvulsivante et neuroprotectrice s'exerce probablement par une combinaison d'effets :

- effets directs de l'inhibition/modification des récepteurs NMDA du glutamate,
- effets indirects de l'inhibition de la libération de glutamate par l'inhibition des récepteurs pré-synaptiques nAChR $\alpha 7$ (Hilmas et Williams 2007).

Après intoxication par le soman, l'interruption de l'EME dû à une stimulation excessive des récepteurs NMDA neuronaux par le glutamate est une faculté que partagent d'autres antagonistes du récepteur NMDA tels que la TCP (Carpentier et al. 1994), le GK-11 (Lallement et al. 1999, Lallement et al. 1998), le MK-801 (Braitman et Sparenborg 1989, Shih 1990, Sparenborg et al. 1992) et la KET (Dorandeu et al. 2005).

IV.2.4 Effets de l'administration de KET/SA sur la réponse neuro-inflammatoire

Le SA peut inhiber l'activation microgliale en agissant sur les récepteurs muscariniques présents sur les cellules microgliales (Hirayama et Kuriyama 2001, Zhang et al. 1998a). Cependant, son administration répétée dans le lot TÉMOINS SOMAN n'a pas

permis d'empêcher le déclenchement d'une réaction inflammatoire centrale dans notre modèle.

Les résultats des expérimentations d'immunohistochimie montrent un effet de la KET sur l'inhibition de l'activation microgliale et astrocytaire consécutive à l'intoxication par le soman. La KET semble cependant avoir une action plus nette sur la prévention des dommages cellulaires que sur la limitation de l'activation gliale. La KET limite l'activation gliale induite par l'EME, sans toutefois la prévenir totalement, en particulier 48 h après l'intoxication. En effet, un certain nombre d'animaux intoxiqués et traités par la KET présentent une forte activation gliale alors que le traitement permet de prévenir la survenue de lésions cellulaires dans les mêmes structures cérébrales. L'existence d'une réponse inflammatoire en l'absence de lésions cellulaires a déjà été décrite dans d'autres modèles. En effet, l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires a été mise en évidence lors de convulsions fébriles qui n'occasionnent pas de morts neuronales (Vezzani et Baram 2007) et lors de crises épileptiques déclenchées par la bicuculline (Vezzani et al. 1999a, Vezzani et al. 2000) chez le rat et la souris, au cours desquelles l'activité épileptique n'induit pas d'événements neurodégénératifs. Le déclenchement d'une réponse inflammatoire cellulaire, même en l'absence de dommages cérébraux colocalisés, n'est donc pas inattendu. L'administration de KET/AS permet probablement de stopper les crises épileptiques dont la durée et l'intensité ne sont pas suffisantes pour causer des lésions cérébrales majeures, mais suffisent pour induire une activation gliale. L'absence de lésions cérébrales visibles peut aussi s'expliquer par l'utilisation de la technique de coloration H&P qui ne permet pas de révéler l'intégralité des dommages cellulaires, tels que la dégénérescence des prolongements neuronaux. Par ailleurs, au temps d'étude 48 h, l'administration de KET/SA ne semble pas toujours avoir un effet bénéfique sur la limitation de l'activation astrocytaire. En effet, la diminution de l'activation gliale n'est pas significative dans l'amygdale et on constate même un effet inverse dans le

cortex piriforme ou dans l'aire CA3. Cette observation s'explique par la faiblesse de la réaction astrocytaire au cours des premiers jours qui suivent l'intoxication dans ces zones cérébrales fortement lésées. Ce phénomène, décrit dans la première partie de notre travail, avec déjà été mis en évidence après intoxication par le soman chez la souris (Baille et al. 2005).

Si 48 h après l'intoxication l'activation gliale et n'est pas complètement inhibée chez les animaux traités par la combinaison KET/SA, on remarque qu'après 7 j, les paramètres cellulaires de la réponse inflammatoire sont pratiquement normalisés. En effet, à ce temps d'étude, le marquage par la lectine IB4 est altéré, ce qui rend difficile la distinction du niveau d'activation microgliale chez les animaux du lot TEMOINS SOMAN. L'activation astrocytaire est massive dans l'ensemble des structures cérébrales. Chez les animaux traités recevant l'une des combinaisons KET/SA, le marquage de la microglie par la lectine est à nouveau fonctionnel, montrant des cellules microgliales quiescentes. L'intensité de l'expression de GFAP est fortement diminuée, proche du niveau de base, dans l'ensemble des structures étudiées. Le retour au niveau de base, particulièrement net pour l'activation microgliale s'explique par le caractère séquentiel de l'activation microgliale (Ponomarev et al. 2006), qui n'est pas du type « tout ou rien », les cellules microgliales activées pouvant retourner à l'état quiescent lorsque le stimulus d'activation disparaît.

La présence de KET dans les deux combinaisons testées permet de limiter les effets de l'intoxication sur l'augmentation du taux relatif des ARNm étudiés et de leur protéines. Les protocoles testés n'ont toutefois pas permis d'empêcher totalement l'augmentation du taux relatif d'ARN de certains médiateurs de l'inflammation ou de leurs protéines. Les deux protocoles permettent de réduire l'augmentation du taux des ARNm de SOCS3, IL-1 β , IL-6, TNF α , ICAM-1 et CXCL1 et de limiter de manière significative l'augmentation de la

concentration d'IL-1 β , IL-6, ICAM-1 et CXCL1. L'absence d'impact de l'administration de KET sur l'augmentation de la concentration de la protéine TNF α suggère que l'effet neuroprotecteur de la KET ne passe pas par une action sur l'expression de cette cytokine. Cependant, en raison de la cascade d'événements que peut déclencher la présence des cytokines inflammatoires, une faible modification du taux de l'un de ces médiateurs peut avoir des répercussions notables sur les réponses induites ultérieurement.

À l'inverse du TNF α , le taux d'ARNm de CCL5 est peu influencé par l'administration de KET, alors que la synthèse de la protéine CCL5 est fortement réduite. Cela peut s'expliquer par un effet sur la régulation post-transcriptionnelle ou traductionnelle de cette chimiokine.

SOSC3 est impliquée comme modulateur du signal cytokinique produit notamment par l'IL-6, qui agit sur la synthèse de l'ARNm de SOCS3 (Crocker et al. 2003, Fujimoto et Naka 2003, Lang et al. 2003). Ainsi, la détermination de la concentration de la protéine SOCS3 n'est pas indispensable pour évaluer l'effet de KET/SA sur cette voie inflammatoire.

Les résultats des expérimentations d'immunohistochimie mettant en évidence un effet de la KET sur la limitation de l'activation microgliale et astrocytaire sont cohérents avec les effets de la KET sur la production des ARNm et protéines de médiateurs de l'inflammation. Les cellules gliales étant la source principale de médiateurs de l'inflammation (Vezzani et al. 2008), il n'est pas surprenant de constater la concordance des effets de la KET sur ces différents mécanismes de la réponse neuro-inflammatoire

En plus de son action neuroprotectrice, l'administration de KET/SA pourrait ainsi prévenir d'autres perturbations plus tardives telles que l'épileptogénèse, dont la mise en place est favorisée par l'activation gliale et la présence de cytokines pro-inflammatoires, indépendamment de leurs effets neurotoxiques (Vezzani et Baram 2007). Afin de préciser cet effet, il serait nécessaire d'évaluer l'effet de la KET sur l'épileptogénèse ainsi que sur

l'évolution de la concentration de médiateurs de l'inflammation épileptogènes tels que l'IL-1 β ou la PGE₂, pendant plusieurs semaines après l'intoxication par le soman.

Le mécanisme par lequel la KET agit sur la réponse neuro-inflammatoire reste à déterminer. L'activité inhibitrice de la KET sur ce phénomène peut s'expliquer indirectement, comme nous l'avons constaté, par la limitation de la durée des crises convulsives et des dommages cellulaires associés. Cependant, des effets directs de la KET ont été mis en évidence *in vitro* et *in vivo* sur l'inhibition de la réponse inflammatoire de cellules périphériques (Kawasaki et al. 1999, Shimaoka et al. 1996, Takenaka et al. 1994) et de cellules gliales (Shibakawa et al. 2005). Les mécanismes moléculaires en jeu ne sont pas précisément connus et différentes voies de régulation sont susceptibles d'être mises en jeu. La KET peut inhiber l'activation de NF- κ B (Sakai et al. 2000), un régulateur intracellulaire de la transcription des gènes de cytokines pro-inflammatoires (Ghosh et al. 1998), qui peut être activé par les crises d'épilepsie (Won et al. 1999). Les effets de la KET pourraient également s'expliquer par une action directe sur la microglie, comme l'évoquent des résultats obtenus avec le MK-801 suggérant la présence de récepteurs au glutamate sur les cellules microgliales (Hirayama et Kuriyama 2001) et montrant l'effet inhibiteur de l'activation microgliale de cet anti-NMDA dans un autre modèle (Thomas et Kuhn 2005). Dans le cas du traumatisme crânien, un autre modèle de lésions cérébrales, le développement d'une réaction inflammatoire périphérique accentue la gravité des lésions cérébrales par l'intermédiaire de l'IL-1 β et de mécanismes favorisant le passage des GNN circulants vers le parenchyme cérébral (McColl et al. 2007). Les effets anti-inflammatoires périphériques de la KET pourraient donc expliquer une partie de ses effets neuroprotecteurs. Différents mécanismes sont susceptibles d'être impliqués. L'augmentation du taux de noradrénaline induit par la KET (Kohrs et Durieux 1998) peut être une première voie de régulation de la réponse inflammatoire systémique (Feinstein et al. 2002). La libération d'adénosine induite par la

KET pourrait aussi expliquer ses effets anti-inflammatoires par la stimulation des récepteurs A2A par l'adénosine (Mazar et al. 2005). Enfin, les effets de la KET sur la limitation de la production des chimiokines, des molécules d'adhésion et l'inhibition de l'infiltration du parenchyme par les GNN (nos résultats) permettent de penser que les combinaisons KET/SA administrées contribueraient à limiter l'infiltration du parenchyme cérébral par les cellules circulantes et à lutter contre les conséquences pro-inflammatoires et pro-épileptogènes de ce phénomène (Fabene et al. 2008). Inversement, *in vitro*, la KET exerce un effet activateur des récepteurs microgliaux purinergiques P2X₇ (Nakanishi et al. 2007) dont l'expression et l'activité sont augmentés à la suite d'un EME (Avignone et al. 2008). L'activation des récepteurs P2X₇ favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules microgliales (Chakfe et al. 2002, Le Feuvre et al. 2003) et régule l'infiltration du parenchyme cérébral par les leucocytes circulants à la suite d'un EME (Kim et al. 2010). L'effet anti-inflammatoire central de la KET ne s'exerce donc probablement pas par l'intermédiaire de ces récepteurs P2X₇.

V. Expérimentations complémentaires

V.1 Évaluation de l'efficacité thérapeutique du protocole KET100/SA modifié

Une surmortalité liée au surdosage de KET est observée lors de l'utilisation du protocole anesthésique (KET100/SA).

Afin de limiter ce phénomène de surmortalité, tout en conservant le même délai entre l'intoxication et la première administration de KET100/SA, nous avons choisi de tester l'efficacité de différents protocoles dérivés du protocole initial.

Les décès des animaux traités avec ce protocole anesthésique étant constatés après la 2^{ème} (1/47) et principalement après la 3^{ème} injection (10/47) de la combinaison KET100/SA, nous avons souhaité vérifier que l'administration à 3 reprises du traitement était indispensable

pour obtenir une efficacité neuroprotectrice satisfaisante. Nous avons donc testé l'efficacité de différents protocoles incluant 1 ou 2 administrations répétées de KET/SA à dose anesthésique. Enfin, nous avons testé un protocole consistant à éviter le surdosage de KET en ne réalisant la 3^{ème} injection du protocole anesthésique que lorsque les animaux présentent les premiers signes de fin de narcose.

V.1.1 Étude de l'efficacité de l'administration unique ou répétée d'une combinaison KET100/SA toutes les 60 min

Les animaux du lot TÉMOINS SOMAN (n = 41) ont été comparés à deux lots d'animaux qui ont reçu une combinaison de KET100/SA, la première administration étant réalisée 60 min après l'intoxication par le soman. Cette administration a été unique dans le lot SOMAN/KET100/SA(1) (n = 11), ou répétée 1 fois dans le lot SOMAN/KET100/SA(2) (n = 10), la 2^{ème} administration étant espacée de 60 min de la précédente (Figure n° 51).

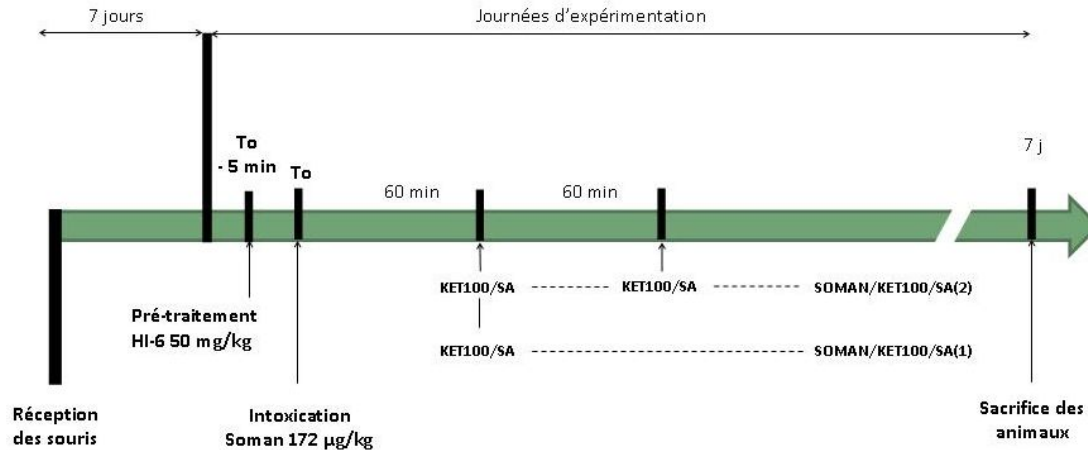


Figure n° 51 : Protocole expérimental appliqué aux lots, SOMAN/KET100/SA(2) et SOMAN/KET100/SA(1).

Les différents lots ont fait l'objet d'un suivi de mortalité et de masse corporelle (Figure n° 52) et d'une évaluation du niveau de lésions cérébrales (Figure n° 53). Les

dommages cellulaires ont été évalués par une technique semi-quantitative après coloration par H&P, comme dans l'ensemble des expérimentations (voir p. 287).

Dans les lots SOMAN/KET100/SA(1), SOMAN/KET100/SA(2), 1 et 2 animaux sont respectivement décédés au cours de la première heure suivant l'intoxication, avant le début de l'administration des traitements. Seul un animal est décédé le 5^e jour dans le lot SOMAN/KET100/SA(2). Les taux de mortalité des lots différents lots après traitement sont donc de 0 % pour le lot SOMAN/KET100/SA(1) (n = 11), et de 10 % pour le lot SOMAN/KET100/SA(1) (n = 10)

Le suivi de la masse corporelle sur 48 h et 7 j montre que seul le lot recevant le protocole initial incluant 3 injections répétées de KET100/SA présente une perte de masse corporelle statistiquement moins importante que le groupe TÉMOINS SOMAN (Figure n° 52).

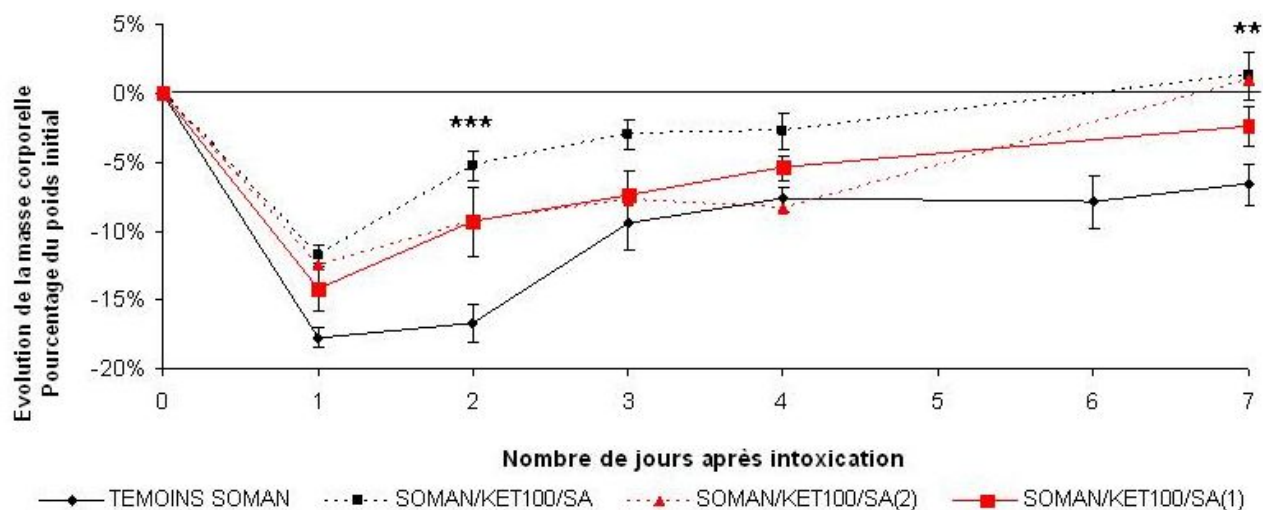


Figure n° 52 : Évolution de la masse corporelle exprimée en % de perte par rapport au poids initial dans les lots traités avec différentes répétitions d'une combinaison KET/SA.

Le traitement KET100/SA est administré 3 fois, 2 fois ou 1 seule fois dans les lots SOMAN/KET100/SA, SOMAN/KET100/SA(2), SOMAN/KET100/SA(1), en comparaison avec le lot TÉMOINS SOMAN.

Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de perte/gain de poids \pm ES par rapport au poids initial. Le lot TÉMOINS SOMAN a été comparé successivement aux lots SOMAN/KET100/SA(2), SOMAN/KET100/SA(1) et SOMAN/KET100/SA (*) par comparaison des aires sous la courbe du suivi de la masse corporelle pendant 48 h et 7 j. (**) $\alpha < 0,01$; (***) $\alpha < 0,001$. Pour les temps d'études 1, 2, 3, 4, 6 et 7 j : TÉMOINS SOMAN : n = 45, 45, 15, 4, 11 et 15 ; SOMAN/KET100/SA : n=36, 36, 10, 10, 10, 0 et 10 ; SOMAN/KET100/SA(2) : n= 7, 7, 7, 7, 0 et 6 ; SOMAN/KET100/SA(1) : n=8, 8, 8, 8, 0 et 8 ;.

Les dommages cellulaires (éosinophilie) ont été évalués comme dans l'ensemble des études à 7 j, avec attribution d'un score lésionnel à chaque zone étudiée, pour chaque animal (voir p. 287). Un score lésionnel global a ensuite été attribué à chaque animal grâce à la moyenne des scores attribués dans les 5 régions étudiées. Pour chaque lot expérimental, les résultats ont été exprimés par la moyenne \pm ES des scores individuels (Figure n° 53).

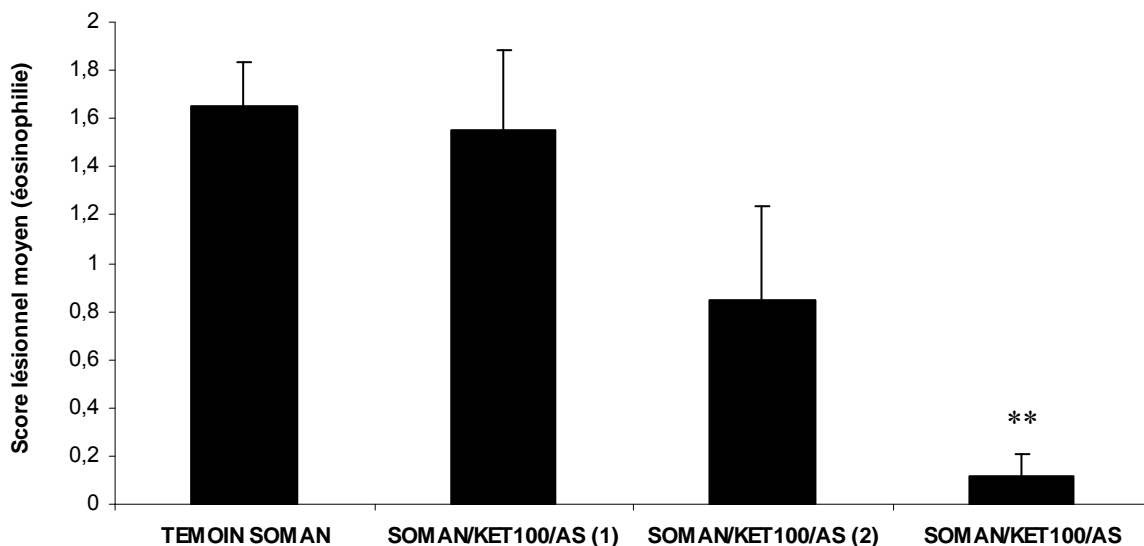


Figure n° 53 : Comparaison des dommages cellulaires observés 7 j après une intoxication par une dose convulsivante de soman et traitement par 1, 2 ou 3 administrations d'une combinaison KET100/SA.

Un score lésionnel global est attribué à chaque animal grâce à la moyenne des scores attribués dans les 5 régions étudiées (septum latéral, cortex piriforme, amygdale, CA1 et CA3). Les résultats ont été exprimés par la moyenne \pm ES des scores individuels.

Pour les lots TÉMOINS SOMAN, SOMAN/KET100/SA(1), SOMAN/KET100/SA(2), SOMAN/KET100/SA : n = 15, 4, 4 et 5.

Le lot TÉMOINS SOMAN a été comparé successivement aux lots SOMAN/KET100/SA(1), SOMAN/KET100/SA(2) et SOMAN/KET100/SA (*). (**) $\alpha < 0,01$.

La comparaison du lot TÉMOIN SOMAN aux lots SOMAN/KET100/SA(1) et SOMAN/KET100/SA(2) ne montre pas de différence significative, bien qu'une tendance à la diminution du niveau de lésions soit constatée dans le lot recevant 2 injections successives de

KET100/AS. La répétition de 3 injections pour couvrir une durée d'action suffisamment longue est donc indispensable pour obtenir une neuroprotection satisfaisante. La problématique de la surmortalité liée au surdosage de KET ne peut donc pas être résolue en limitant l'administration de la combinaison KET100/SA à 1 ou 2 injections puisque le protocole de traitement n'est pas efficace dans ces conditions.

V.1.2 Étude de l'efficacité d'une modification du protocole KET100/SA en décalant la 3^e injection de KET/SA au moment de la fin de l'anesthésie

Nous avons testé une variante du protocole SOMAN/KET100/SA. Celle-ci a consisté à ne réaliser la 3^e injection de KET100/SA que lorsque les animaux présentent les premiers signes de réveil. Sur un total de 8 animaux, la 3^e administration a été réalisée soit 90 min (SOMAN/KET/100/SA D90) (n = 4), soit 120 min (SOMAN/KET/100/SA D120) (n = 4) après la 2^e injection (Figure n° 54).

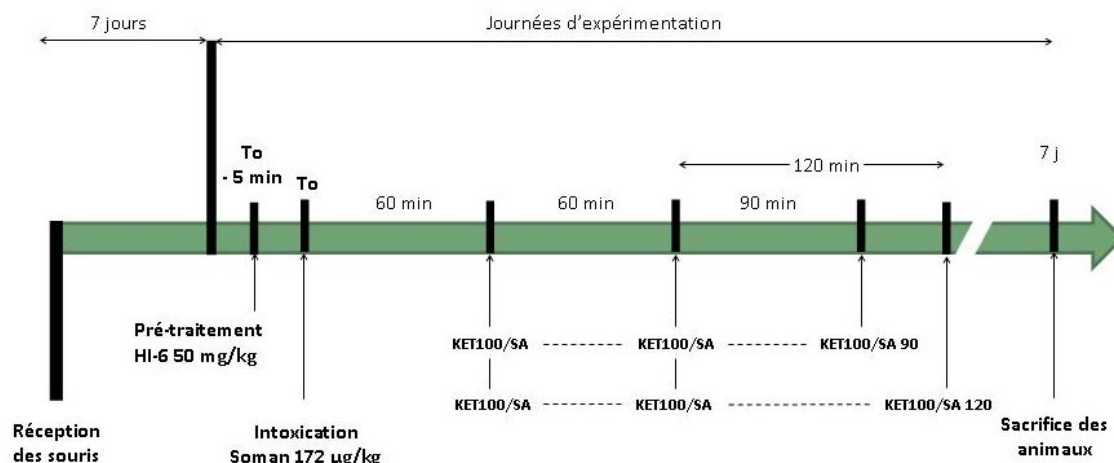


Figure n° 54 : Protocole expérimental appliqué au lot SOMAN/KET100/SA décalé.

Le taux de mortalité, l'évolution du pourcentage de perte de masse corporelle et les dommages cellulaires ont été évalués comme lors de l'étude précédente. Les lésions

cellulaires ont été exprimés par la moyenne \pm ES des scores lésionnels individuels (Figure n° 56).

Les résultats obtenus ont été comparés aux résultats du groupe TÉMOINS SOMAN obtenus dans les expérimentations précédentes.

Sur les 8 animaux inclus dans l'expérimentation, un seul décès a été constaté dans le lot SOMAN/KET/100/SA D120.

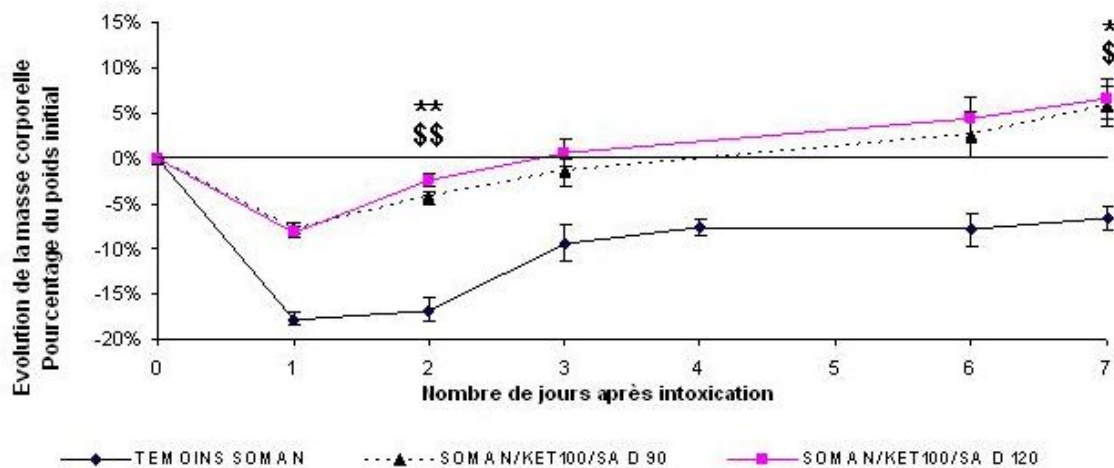


Figure n° 55 : Évolution de la masse corporelle exprimée en % de perte par rapport au poids initial après intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg) et traitement par un protocole KET100/SA modifié.

Le protocole testé correspond au traitement appliqué au lot SOMAN/KET100/SA, la 3^e injection de KET100/SA étant décalée au moment du réveil de l'animal, soit 90 min (SOMAN/KET100/SA D90) (n = 4), soit 120 min (SOMAN/KET100/SA D120) (n = 3) après la 2^e injection. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de perte/gain de poids \pm ES, par rapport au poids initial. Le lot TÉMOINS SOMAN, issu des expérimentations antérieures a été comparé successivement au lot SOMAN/KET100/SA D90 (*) et au lot SOMAN/KET100/SA D120 (\$) par comparaison des aires sous la courbe du suivi de la masse corporelle pendant 7 j. (*,\$) $\alpha < 0,05$; (**,\$\$) $\alpha < 0,01$. Pour les temps d'études 1, 2, 3, 4, 6 et 7 jours ; TÉMOINS SOMAN : n = 45, 45, 15, 4, 11 et 15, SOMAN/KET100/SA D90 : n = 4, 4, 4, 0, 4, et 4 ; SOMAN/KET100/SA D120 : n = 3, 3, 3, 0, 3, et 3.

La comparaison de la perte de masse corporelle sur 7 jours ne permet pas de mettre en évidence de différence entre les lots SOMAN/KET/100/SA D90 et SOMAN/KET/100/SA D120.

Seules quelques cellules éosinophiles sont détectées dans le septum de 1 animal du lot SOMAN/KET/100/SA D90. Aucune cellule éosinophile n'est visible dans les autres structures étudiées. Aucune zone évoquant des pertes cellulaires n'est observée.

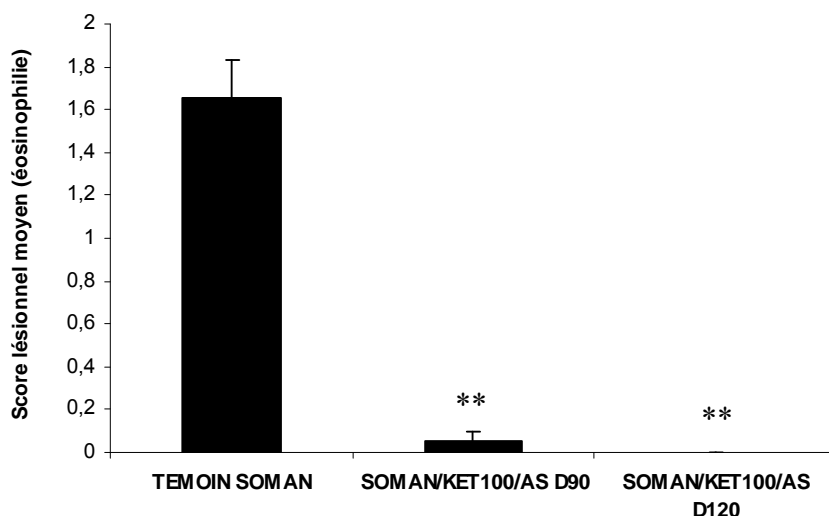


Figure n° 56 : Comparaison des dommages cellulaires observés 7 j après intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg) et traitement par un protocole KET100/SA modifié.

Le protocole testé correspond au traitement appliqué au lot SOMAN/KET100/SA, la 3^e injection de KET100/SA étant décalée au moment du réveil de l'animal, soit 90 min (SOMAN/KET100/SA D90), soit 120 min (SOMAN/KET100/SA D120) après la 2^e injection..

Un score lésionnel global est attribué à chaque animal grâce à la moyenne des scores attribués dans les 5 régions étudiées (septum latéral, cortex piriforme, amygdale, CA1 et CA3). Les résultats ont été exprimés par la moyenne ± ES des scores individuels. Le lot TÊMOINS SOMAN a été comparé successivement au lot SOMAN/KET100/SA D90 et au lot SOMAN/KET100/SA D120

Pour les lots TÊMOINS SOMAN, SOMAN/KET100/SA D90 et SOMAN/KET100/SA D120 : n = 15, 4 et 3. (**) $\alpha < 0,01$.

Ce protocole modifié permet donc de limiter la surmortalité liée à l'accumulation et au surdosage de KET, tout en montrant une efficacité neuroprotectrice identique au protocole initial. Ces éléments permettent de suggérer les bases d'un protocole de traitement retardé qui pourrait être utilisé chez l'homme en cas d'intoxication par les NOP : une administration d'une forte dose initiale de KET/SA permettant de stopper l'EME, puis une administration renouvelée lors de l'apparition des premiers signes de réveil de la victime intoxiquée pourrait constituer un schéma thérapeutique judicieux. L'association d'autres molécules telles que les benzodiazépines avec la combinaison KET/SA permettrait certainement d'améliorer le protocole thérapeutique. Les benzodiazépines, couramment utilisées en association avec la

KET en anesthésie, potentialisent son activité, ce qui permet d'abaisser sa dose efficace, limitant ainsi les risques liés au surdosage.

V.2 Effets de la combinaison thérapeutiques KET100/SA sur le bourgeonnement des fibres moussues – étude préliminaire

Les pertes neuronales, la production de médiateurs de l'inflammation, le développement d'une activation gliale ou la réorganisation synaptique dans l'hippocampe font partie des pistes explorées pour expliquer le phénomène d'épileptogenèse. Cette mise en place d'un état chronique caractérisé par la récurrence de crises spontanées aboutissant à la transformation du cerveau « sain » en cerveau « épileptique » peut être déclenchée par un EME initial.

Le phénomène de bourgeonnement des fibres moussues dans l'hippocampe a été mis en évidence 15 j après intoxication par le soman (Rondouin et al. 1993) mais reste peu étudié dans ce modèle. Une dispersion des cellules granulaires du GD et un bourgeonnement de leurs axones (les fibres moussues) ont été mis en évidence dans l'hippocampe « épileptique » humain (Sloviter 2005), ainsi que dans certains modèles animaux d'EMLT (Dudek et Sutula 2007). Ce bourgeonnement, rendu visible par la coloration sensible au zinc (coloration de Timm), forme de nouvelles connexions en région infra-pyramidale de la couche CA3. De plus, un bourgeonnement rétrograde des fibres moussues par extension de collatérales additionnelles vient innover les dendrites apicales des cellules granulaires, aboutissant à des néo-connexions supra-granulaires au niveau du GD, le tout formant un circuit fonctionnel excitateur récurrent. Il a été démontré, dans de nombreux modèles expérimentaux, que des agressions épileptogènes comme un EME initial, un traumatisme crânien ou un accident vasculaire cérébral pouvaient induire un bourgeonnement de ces prolongements axonaux (Pitkanen et al. 2007). Ces réorganisations synaptiques pourraient conférer au GD, en particulier, une excitabilité accrue et donc un rôle potentiel dans la mise en place des mécanismes d'épileptogenèse après intoxication par le soman.

Nous avons donc souhaité évaluer l'existence de bourgeonnement des fibres moussues dans l'hippocampe après intoxication par le soman, et mesurer les effets de l'administration de la KET sur ce phénomène.

Des animaux du lot TÉMOINS SOMAN ou des animaux témoins non intoxiqués ne recevant que le prétraitement HI-6 (TÉMOINS HI-6), ont été comparés à des animaux intoxiqués recevant différentes combinaisons de KET/SA comme le présente le Tableau n° 9.

Protocole de traitement	Nombre d'animaux	Temps de prélèvement
TÉMOINS HI-6	3	70 j
TÉMOINS SOMAN	3	70 j
SOMAN/KET100/SA modifié (*) (la dose de KET des 2 ^e et 3 ^e injections est abaissée à 50 mg/kg)	3	70 j
SOMAN/KET100/SA	1	110 j
SOMAN/KET100/SA(2)	1	110 j
SOMAN/KET100/SA(1)	1	110 j

Tableau n° 9 : Répartition des lots d'animaux visant à évaluer les effets de la combinaison KET100/AS sur le bourgeonnement des fibres moussues.

(*) : Animaux provenant d'autres expérimentations réalisées au laboratoire.

Les animaux des différents lots ont été sacrifiés 70 ou 110 j après l'intoxication. Sur les coupes en paraffine de tissus perfusés-fixés, le bourgeonnement des fibres moussues a été recherché par la coloration de Timm (voir p. 283).

Nous avons mis en évidence un phénomène de bourgeonnement des fibres moussues dans le GD et la région CA3 de l'hippocampe chez les 3 animaux témoins intoxiqués (3/3) du lot TÉMOINS SOMAN 3. Les différences d'intensité de coloration permettent de visualiser un bourgeonnement peu important dans le GD chez 2 animaux, et un bourgeonnement massif chez le 3^e (Figure n° 57). Ce phénomène n'est retrouvé chez aucun des animaux ayant reçu un des protocoles de traitement par la combinaison KET100/SA.

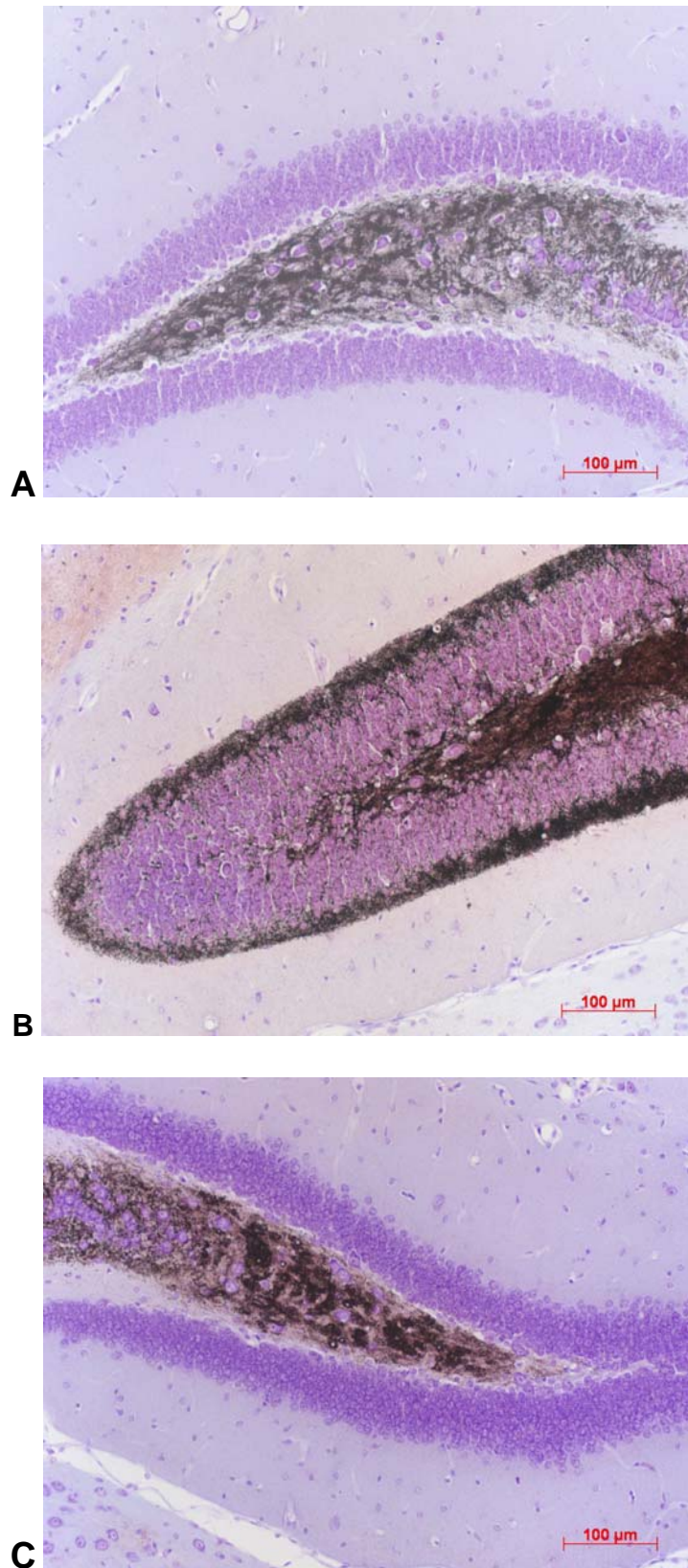


Figure n° 57 : Évaluation du bourgeonnement des fibres moussues dans le GD.

A : Animal témoin non intoxiqué (TÉMOINS HI-6) ; B : Animal témoin intoxiqué non traité avec la kétamine (TÉMOINS SOMAN). C : Animal intoxiqué traité avec une combinaison KET/SA (SOMAN/KET100/SA).

Même s'il convient de rester prudent en raison du faible effectif utilisé dans cette expérimentation, ces résultats confirment l'existence d'un bourgeonnement des fibres moussues dans l'hippocampe mis en évidence 15 j après intoxication par le soman (Rondouin et al. 1993).

Les données obtenues chez les animaux intoxiqués et traités avec l'un des protocoles incluant la KET sont en accord avec les résultats obtenus dans d'autres modèles d'EME chez le rat, montrant que la KET permettrait de limiter le bourgeonnement des fibres moussues observé dans le GD après stimulation électrique (Chen et al. 2001, Lamont et al. 2005).

Synthèse

L'objectif initial de ce travail consistait dans un premier temps à préciser différents paramètres de la réponse inflammatoire centrale associée aux lésions cérébrales dans un modèle murin d'état de mal épileptique réfractaire obtenu par l'administration d'une dose convulsivante de soman.

Dans une seconde partie, nous avons voulu confirmer, dans ce modèle, les effets neuroprotecteurs de l'administration retardée de la kétamine (KET) en association avec le sulfate d'atropine (SA) et étudier ses effets sur la réponse neuro-inflammatoire précédemment mise en évidence.

1. Intoxication expérimentale par le soman et réponse neuro-inflammatoire centrale chez la souris

L'état de mal épileptique (EME) consécutif à une intoxication par le soman est associé au développement de lésions irréversibles du tissu cérébral et à une réaction neuro-inflammatoire. Celle-ci, bien décrite dans diverses affections du SNC, et en particulier dans des modèles d'épilepsie, reste mal décrite après l'intoxication par le soman. Dans d'autres modèles d'EME, il a été montré qu'elle favorise le déclenchement et le maintien des crises, l'aggravation des lésions cellulaires associées, ainsi que le développement de l'épileptogénèse.

Afin de permettre des études ultérieures sur le rôle de la neuro-inflammation dans le développement des lésions cellulaires liées à l'intoxication par le soman, la description des modifications neuro-inflammatoires au niveau cellulaire et moléculaire était nécessaire. Nous avons ainsi pu confirmer ou montrer au cours de ce travail plusieurs points importants ; les lésions cérébrales observées sont associées à :

- i. Une activation microgliale et astrocytaire massive, toujours présente 7 j après l'intoxication, confirmant les résultats obtenus dans d'autres modèles,
- ii. Une infiltration transitoire du parenchyme cérébral par les GNN,
- iii. Une augmentation du taux relatif d'ARNm de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, de molécules d'adhésion et d'enzymes de la voie des eicosanoïdes dans le cortex et l'hippocampe,
- iv. Une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, de molécules d'adhésion et d'enzymes de la voie des eicosanoïdes

Cette étude descriptive ne permet pas d'établir de liens directs entre la réaction neuro-inflammatoire et le développement des lésions cellulaires. L'inflammation centrale est certainement à la fois la cause et la conséquence des lésions cellulaires.

Un certain nombre des éléments mis en évidence dans notre étude penchent en faveur d'un rôle délétère de l'inflammation sur le tissu cérébral :

- i. Les cytokines pro-inflammatoires étudiées exercent des effets nocifs principalement en potentialisant le fonctionnement des récepteurs ionotropes du glutamate (Beattie et al. 2002, Viviani et al. 2003),
- ii. L'expression de chimiokines et de molécules d'adhésion facilite l'infiltration du parenchyme par les cellules périphériques. Ce phénomène favorise l'entretien de la réaction inflammatoire, et augmente la perméabilité de la BHE (Fabene et al. 2008), ce qui peut conduire à une altération de l'homéostasie tissulaire cérébrale. Ces modifications

augmentent l'excitabilité neuronale et favorisent le développement de l'épileptogenèse (Ivens et al. 2007),

- iii. L'augmentation de l'expression d'enzymes de la voie des eicosanoïdes favorise la production de PGE₂. Leur présence augmente l'excitabilité neuronale hippocampique (Chen et Bazan 2005) et favorise les morts neuronales après un EME (Takemiya et al. 2006).

Inversement, un certain nombre d'éléments de la réponse inflammatoire mise en évidence dans nos expérimentations sont susceptibles de jouer un rôle protecteur :

- i. L'activation des cellules microgliales peut favoriser la survie neuronale, notamment par le nettoyage des débris cellulaires (Rapalino et al. 1998) et la libération de facteurs neurotrophiques (Schwartz et al. 2006),
- ii. L'augmentation de l'expression d'enzymes de la voie des eicosanoïdes est susceptible de favoriser la production de PGD₂ qui semble disposer de propriétés antiépileptiques (Akarsu et al. 1998).

Les phénomènes inflammatoires que nous avons mis en évidence semblent donc pouvoir jouer le rôle d'une arme à double tranchant sur l'évolution de l'intégrité du parenchyme cérébral. Les répercussions potentiellement néfastes semblent majoritaires et concernent l'aggravation des lésions cérébrales à distance de l'EME initial et le développement d'une épileptogenèse.

Limiter cette neuro-inflammation peut constituer une bonne approche thérapeutique. C'est ce qui nous a incité à étudier le potentiel de combinaisons thérapeutiques à base de kétamine sur la réponse inflammatoire centrale.

2. Effet neuroprotecteur et anti-inflammatoire de la kétamine chez des souris intoxiquées par une dose convulsivante de soman

Après intoxication par le soman, les traitements classiques à base de benzodiazépines perdent leur efficacité antiépileptique au delà de 10 à 20 min de crises. Les anti-NMDA ayant montré leur intérêt au laboratoire lorsque le traitement débute au-delà de cette courte fenêtre thérapeutique, nous avons souhaité confirmer les effets neuroprotecteurs de la KET associée au SA lorsque le début du traitement n'est initié que 30 ou 60 min après l'intoxication. Nous avons aussi étudié l'impact des deux protocoles testés sur la réponse neuro-inflammatoire centrale associée à l'EME et aux lésions cellulaires induites par le soman.

Notre choix s'est porté vers cette molécule car c'est le seul anti-NMDA disposant d'une AMM chez l'homme, disponible sous forme injectable. Son utilisation est bien maîtrisée en anesthésiologie et elle possède des propriétés anti-inflammatoires.

Dans cette seconde partie, les résultats obtenus chez les animaux intoxiqués par le soman ont permis de :

- i. Montrer que l'administration répétée de SA :
 1. A un effet neuroprotecteurs sur plusieurs régions cérébrales,
 2. N'a pas d'effet significatif sur l'importance de la réaction neuro-inflammatoire révélée lors de notre première étude,
- ii. Confirmer l'effet neuroprotecteur de la combinaison KET/SA démontré chez le cobaye, même en cas d'administration retardée 60 min après l'intoxication,
- iii. Montrer que l'administration d'une combinaison KET/SA limite :
 1. l'activation microgliale et astrocytaire
 2. les composantes géniques et protéiques de la production de médiateurs de l'inflammation dans le cerveau

- iv. Montrer que l'administration d'une combinaison KET/SA bloque l'infiltration du parenchyme cérébral par les GNN,
- v. Montrer que le rythme d'administration de KET/SA peut se baser sur des paramètres cliniques tels que la profondeur de la narcose. La prise en considération du niveau de sédation permet de limiter le risque de toxicité lié à un surdosage de KET, tout en conservant une efficacité neuroprotectrice optimale.

Enfin, une expérimentation très préliminaire suggère une action préventive de la KET/SA sur les phénomènes de bourgeonnement des fibres moussues dans l'aire CA3 et le GD.

Perspectives

Au terme de ce travail, de nombreuses questions restent posées. Les quelques perspectives expérimentales proposées ci-dessous, bien que non exhaustives, pourraient répondre à une partie de ces questions.

1. Implication des cellules microgliales dans les processus neuro-inflammatoires

Comme nous l'avons vu, l'activation des cellules microgliales est l'un des événements majeurs de la réaction neuro-inflammatoire dans notre modèle.

Les cellules microgliales prolifèrent et migrent vers les sites lésionnels où elles contribuent à l'aggravation des dommages cellulaires par la libération de molécules neurotoxiques et de cytokines pro-inflammatoires (Chao et al. 1995). Inversement, elles peuvent favoriser la survie et la récupération fonctionnelle neuronales, notamment par le nettoyage des débris cellulaires (Rapalino et al. 1998) et la libération de facteurs neurotrophiques (Schwartz et al. 2006). Nos expérimentations ne nous permettent pas de préciser le caractère bénéfique ou délétère de l'activation microgliale que nous avons mise en évidence. Nous envisageons d'évaluer les effets de traitements inhibiteurs de l'activation microgliale (minocycline) sur les dommages cellulaires et la réponse inflammatoire induits par l'EME après intoxication par le soman.

Le marquage utilisé ne nous permet pas de différencier les cellules microgliales résidentes activées (amiboïdes) des éventuels macrophages infiltrant le parenchyme cérébral. Il serait pourtant intéressant d'objectiver une probable infiltration du tissu cérébral par des monocytes circulants. Il n'existe pas de marqueurs fiables permettant une différenciation entre cellules microgliales, macrophages et monocytes par les techniques d'immunohistochimie habituelles.

Nous envisageons de rechercher cette infiltration en utilisant des macrophages marqués par des nanoparticules de fer qui pourraient être plus facilement détectées dans le parenchyme cérébral.

Nous avons constaté l'impossibilité de différencier les cellules marquées par la GSA-IB4 7 j après l'intoxication par le soman alors qu'après traitement par une combinaison KET/AS, le marquage redevient possible. Cette observation peut s'expliquer par une absence des cellules microgliales elles-mêmes, ou plus probablement par une diminution de l'efficacité du marquage des cellules microgliales par la lectine. Des modifications influençant l'accessibilité de composants de la membrane des cellules microgliales, et en particulier des modifications des chaînes polysaccharidiques sur lesquelles se fixe la lectine pourraient expliquer ces observations (Navarro 2007, Takahashi et al. 2008). La lectine IB4 se lie spécifiquement aux résidus galactose exprimés à la surface de nombreuses cellules, dont les cellules endothéliales (Benton et al. 2008). Il est ainsi possible que l'angiogenèse mise en évidence chez l'homme souffrant d'EMLT (Rigau et al. 2007), multiplie le nombre de cibles pour la lectine, diffusant ainsi le marquage et diminuant sa spécificité pour les cellules microgliales/macrophagiques. Toutefois, le marquage très diffus constaté n'est pas en faveur d'un marquage accru de cellules endothéliales. La détection immunohistochimique par d'autres marqueurs tels qu'Iba1 pourrait permettre de vérifier la présence toujours effective des cellules microgliales à partir de 7 j post-intoxication.

2. Rôle pro-épileptogène de l'IL-1

Une augmentation de la concentration sérique d'IL-1 β a été mise en évidence après un EME induit par la pilocarpine chez le rat (Marchi et al. 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'augmentation de l'expression intracérébrale de l'IL-1 β favorise la perméabilité de la BHE et l'intensité des crises et des lésions cérébrales associées (Shaftel et al. 2007). Dans le même modèle d'EME induit par la pilocarpine, l'administration systémique préventive d'IL-1ra a

permis de limiter l'intensité des crises et de diminuer la perméabilité de la BHE (Marchi et al. 2009).

Il serait souhaitable, dans notre modèle d'intoxication, de mesurer l'évolution de la concentration sérique d'IL-1 β , dont la présence dans le sang peut avoir un impact sur l'intensité de l'EME induit par le soman.

L'IL-1ra traverse la BHE (Clark et al. 2008), et pourrait donc inhiber la réponse inflammatoire périphérique liée à l'IL-1 β sérique, mais aussi la réponse inflammatoire centrale due à l'IL-1 β produite dans le parenchyme cérébral. Il serait donc intéressant d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'IL-1ra administrée par voie IV en pré- ou post-traitement de l'intoxication par le soman. Les paramètres à prendre en considération pour évaluer son efficacité pourraient être, dans une première approche : la durée des crises convulsives, l'intensité des dommages cellulaires associés (histologie) et l'activation gliale (IHC), ainsi que l'intensité des crises épileptiques (EEG).

3. Importance de la production de prostaglandines

Les effets de l'intoxication sur les enzymes de la voie des eicosanoïdes laissent présager une production accrue de PGs à la suite de l'EME induit par le soman. Une augmentation de la PGE₂ a été montrée chez le rat, dans le cortex et l'hippocampe, après intoxication par le sarin, 24 – 48 h après l'intoxication, puis lors d'une 2^e phase retardée, durant plusieurs mois (Chapman et Meldrum 2006, Grauer et al. 2008). La PGE₂ est connue pour son action pro-convulsivante alors que la PGD₂ semble avoir une action neuroprotectrice (Taniguchi et al. 2007) et antiépileptique (Akarsu et al. 1998).

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, les effets apparemment contradictoires des traitements anti-COX-2, sont probablement liés à l'action de COX-2 sur la synthèse de différents types de PGs (PGE₂, PGD₂...) qui ne sont pas produites en même quantité et au même moment au cours de l'ictogénèse (Naffah-Mazzacoratti et al. 1995), et

peuvent avoir des effets antagonistes (Liang et al. 2007, Scher et Pillinger 2009, Strauss 2008).

Dans notre modèle d'EME, il serait intéressant d'évaluer l'évolution de la concentration cérébrale de PGE₂ et PGD₂ (Elisa sur broyats de cerveaux), durant plusieurs semaines. Ce type de données pourrait permettre de définir un profil de production de chaque PG, et de cibler une fenêtre thérapeutique durant laquelle les AINS, qui limitent la production de PGs, pourraient avoir une action bénéfique dans notre modèle.

4. Incidence du passage des GNN

Nous avons mis en évidence une infiltration du parenchyme cérébral par les GNN qui se concentrent au niveau des zones lésées. A la suite d'un EME, il est possible de prévenir le passage des cellules immunitaires circulantes à travers la BHE en limitant les interrelations leucocyte-endothélium vasculaire. Dans un modèle d'EME chimio-induit par la pilocarpine chez la souris, la limitation de l'infiltration leucocytaire du parenchyme cérébrale par les GNN a permis de limiter la récurrence des crises induites et leurs conséquences (Fabene et al. 2008).

Il serait intéressant, dans notre modèle, d'évaluer l'efficacité d'anticorps ciblant les molécules d'adhésion afin de limiter l'infiltration du parenchyme par les cellules circulantes périphériques.

5. Effets de la KET sur la prévention de l'épileptogénèse

Nous avons mis en évidence une efficacité neuroprotectrice très significative de la KET dans notre modèle d'intoxication. Par ailleurs, les premiers résultats préliminaires suggèrent que la KET pourrait inhiber le bourgeonnement des fibres moussues constaté dans l'aire CA3 et le GD, remaniements qui pourraient accompagner l'épileptogénèse.

Il est indispensable de confirmer :

- l'existence de remaniements neuronaux dans l'hippocampe et la mise en place d'une épileptogenèse,

- l'inhibition de ces remaniements et la prévention de l'épileptogenèse après traitement de l'intoxication au soman par la KET.

Ces informations pourront être apportées par des examens histologiques complémentaires et des enregistrements EEG, 8 - 10 semaines après l'EME initial chez des animaux témoins intoxiqués et des animaux traités par une des combinaisons thérapeutiques testées.

6. Effets de la KET sur la prévention des déficits cognitifs

Il est nécessaire d'évaluer l'impact fonctionnel de la neuroprotection mise en évidence dans nos expérimentations. Cette évaluation peut être effectuée grâce à différents tests comportementaux permettant d'évaluer l'atteinte fonctionnelle individualisée, de l'hippocampe du cortex frontal et de l'amygdale.

Nous pourrions faire appel à :

- a. Un test de coordination motrice (rotarod à vitesse croissante)
- b. Des tests d'évaluation de comportements cognitifs : Water maze de Morris, Test de la réponse émotionnelle conditionnée, Labyrinthe en croix surélevé, et Labyrinthe en T.

Ces évaluations du comportement cognitif seront initiées à l'issue d'une période de récupération physiologique de 30 j, puis 60 et 90 j après l'intoxication afin de détecter l'impact fonctionnel de la neuroprotection, mais aussi les conséquences de la mise en place d'une éventuelle épileptogenèse.

7. Mise au point de combinaisons thérapeutiques

Nos expérimentations complémentaires suggèrent que les problèmes de surmortalité liés au surdosage de KET peuvent être réglés par une administration du traitement en fonction de l'état clinique des animaux intoxiqués, tout en conservant une efficacité thérapeutique optimale.

Cependant, afin de réduire les doses administrées, il conviendrait de tester l'efficacité de la KET en association avec des molécules qui potentialisent son activité. En anesthésiologie, la KET est fréquemment administrée en association avec une benzodiazépine, qui permet, avec des doses plus faibles, de combiner l'effet sur le récepteur GABA_A au blocage des récepteurs NMDA. Les doses thérapeutiques de KET adaptées à l'homme pour traiter cette affection restent toutefois à déterminer.

A plus long terme, il devra être envisagé d'évaluer l'intérêt de combinaisons thérapeutiques dont les propriétés bénéfiques auront pu être confirmées par les différentes pistes qui viennent d'être évoquées. Ces combinaisons devront bien entendu permettre en premier lieu de stopper les crises épileptiques et les morts cellulaires cérébrales. Des molécules permettant de cibler précisément certaines voies inflammatoires pourront certainement constituer des traitements adjuvants. Enfin, elles devront surtout avoir prouvé leur efficacité dans la prévention des déficits neurocognitifs fonctionnels et des phénomènes d'épileptogénèse.

Section C – Matériels et méthodes

Animaux, intoxication et traitements

I. Animaux

Les protocoles expérimentaux impliquant des animaux ont tous été soumis et approuvés par 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. Dans cet esprit, toutes les mesures ont été prises pour limiter leur souffrance et réduire le nombre d'animaux utilisés pour les différentes expérimentations.

Les expérimentations sont réalisées sur des souris SWISS mâles adultes, du centre d'élevage JANVIER, ayant un poids de 25 à 30 g. Avant expérimentation, elles sont regroupées par 10 et maintenues en quarantaine (nourriture et eau *ad libitum*) pendant environ 7 jours après leur arrivée, dans une animalerie à température (22 °C) et cycle d'éclairage (8 h – 20 h) contrôlés.

À la suite des procédures expérimentales, les animaux ont été hébergés par lots de 5 à 10 jusqu'à leur sacrifice. Un traitement identique a été appliqué aux animaux témoins.

II. Composants chimiques utilisés

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

L'oxime dichlorure d'HI-6 (1-2-hydroxy-iminométhyl-1-pyridino-3-(4-carbamoyl-1-pyridino-2-oxanopropane)) a été obtenue auprès du centre de Recherche et développement

pour la défense du Canada de Suffield (RDDC Suffield). Le SA provient des laboratoires Sigma-Aldrich[®] (L'Isle-d'Abeau Chesnes, France). La kétamine (KET) (Kétamine Panpharma[®] ; 5 % solution de chlorhydrate) provient des laboratoires Panpharma[®] (Fougères, France). L'ensemble de ces composés a été dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) immédiatement avant leur utilisation, pour permettre une injection sous un volume ne dépassant pas 200 µl, compatible avec l'espèce utilisée.

III. Intoxication des animaux

L'ensemble des intoxications a été réalisé le matin afin de limiter l'impact des modifications circadiennes, et en particulier les variations de l'activité de l'AChE, sur les expérimentations effectuées. Chaque expérimentation a été réalisée au moins en deux fois, pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

Afin d'étudier les effets de l'intoxication sur plusieurs jours, il était nécessaire de disposer d'un modèle animal développant des crises épileptiques de longue durée et survivant au-delà des 24 premières heures. Ce modèle d'intoxication, précédemment défini dans notre laboratoire, consiste en l'administration par injection sous-cutanée d'une dose de 172 µg/kg de soman (200 µl ; s.c.), précédée de 5 min par l'administration intrapéritonéale d'une oxime réactivatrice des cholinestérases périphériques, le dichlorure d'HI-6 (HI-6) (50 mg/kg ; 200 µl ; i.p.) (Baille et al. 2005). L'HI-6 ne franchissant pas la BHE, son administration augmente la survie sans affecter l'état de mal épileptique des animaux intoxiqués par le soman. La dose de soman choisie est très élevée (172 µg/kg = 1,6 DL₅₀ ; DL₅₀ calculée sans médication) pour s'assurer du déclenchement et du maintien de crises convulsives de longue durée. Nos expérimentations n'incluent pas de suivi électroencéphalographique des animaux, mais des études réalisées dans notre laboratoire, selon ce même protocole, ont permis de s'assurer de la correspondance entre le développement des crises convulsives de longue durée et l'existence

d'un EME (Baille et al. 2005). Les lésions cérébrales observées chez les animaux intoxiqués confirment à posteriori l'existence des crises épileptiques.

IV. Traitement des animaux par le sulfate d'atropine et la kétamine

Chaque injection de SA a été réalisée par voie i.p., à la dose de 10 mg/kg, dans un volume de 200 µl. La KET a été diluée dans du NaCl 0,9 % et administrée séparément, par voie i.p. à la dose de 25 ou 100 mg/kg, respectivement dans un volume de 150 et 60 µl.

Quantification des ARNm par RT-qPCR

I. Prélèvement des cerveaux et microdissection des structures cérébrales

Les souris sont sacrifiées par décapitation. L'extraction du cerveau de la boîte crânienne est réalisée immédiatement, et les cerveaux sont placés sur un plan de travail réfrigéré, préalablement désinfectée (Dentasept Spray[®], Anios, Lille-Hellemmes, France) et traité par une solution anti-RNases (RNase away[®], Molecular BioProducts, San Diego, CA). On réalise alors une microdissection et un prélèvement du cortex total, d'une part, ainsi que des hippocampes, d'autre part (Figure n° 58). Les structures sont pesées et incubées pendant 16 h à 24 h dans une solution de RNAlater[®] à 4 °C afin d'améliorer la conservation des ARN, puis congelées à -80 °C jusqu'à leur utilisation après élimination du RNAlater[®].

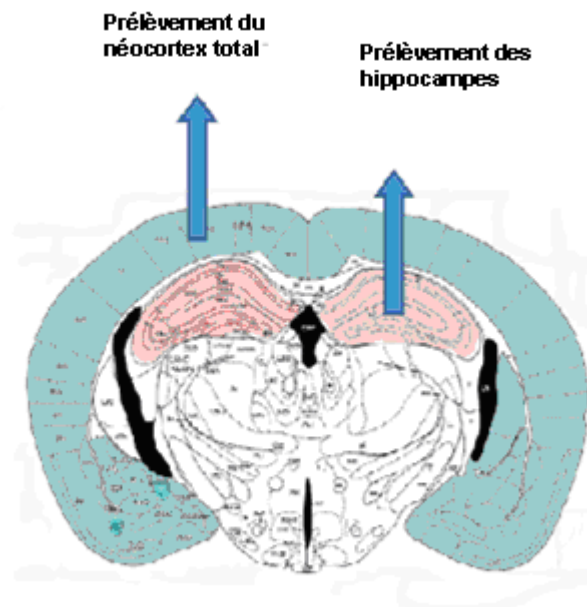


Figure n° 58 : Microdissection cérébrale chez la souris.

II. Traitement des échantillons et préparation des ARN totaux

Chaque échantillon fait l'objet d'un broyage à billes dans un tampon (5 % poids/volume) composé de phénol et d'une solution contenant du thiocyanate de guanidine (RNA Insta Pure[®]; Eurogentec, S.A. Saraing, Belgique).

Le broyage est suivi d'une extraction des ARN totaux à partir de 400 µl du lysat, par ajout de 40 µl de chloroforme dans l'homogénat et de centrifugations successives (Figure n° 59). Ce protocole est adapté à partir de celui décrit par Chomczynski et Sacchi (1987).

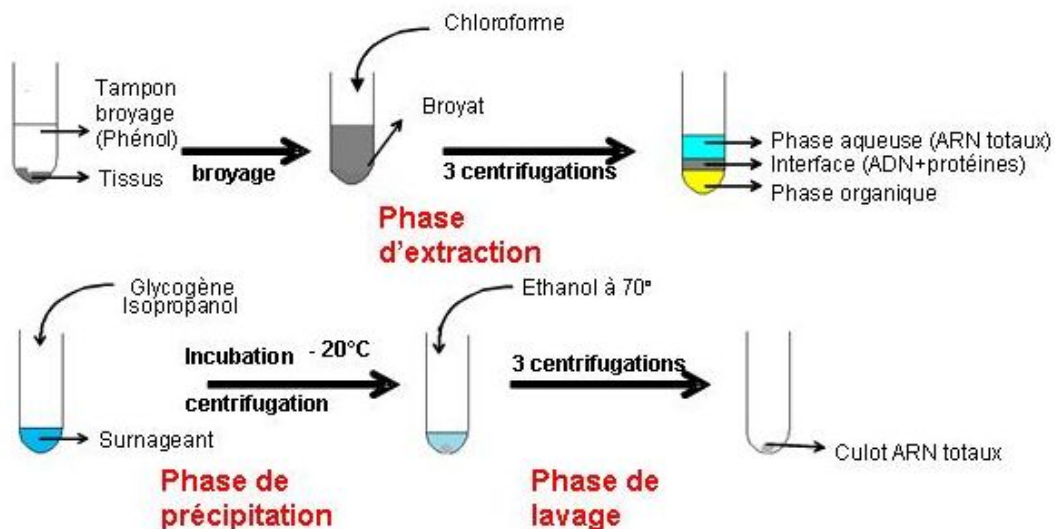


Figure n° 59 : Procédure d'extraction des ARN totaux.

L'ADN et les protéines sont situés à l'interface avec la phase organique hydrophobe. La phase aqueuse supérieure qui contient les ARN est prélevée après chaque centrifugation, puis purifiée à nouveau avec un volume égal de chloroforme. Les ARN sont finalement récupérés sous forme solide suite à la précipitation par l'alcool isopropylique en présence de glycogène après une nuit à -20 °C. Le précipité est ensuite lavé par passages successifs dans

l'éthanol à 70°. Après séchage sous vide, le culot d'ARN est incubé quelques minutes à 65 °C dans l'eau stérile puis congelé à -80 °C jusqu'à son utilisation.

Le rendement de l'extraction d'ARN a été déterminé en mesurant l'absorbance à 260 nm des solutions à l'aide d'un spectrophotomètre (ND-1000, Labtech, Palaiseau, France). La connaissance de la concentration en ARN permet de déterminer ultérieurement le volume de produit d'extraction à utiliser pour les étapes suivantes. La contamination de l'ARN extrait par de l'ADN, ou des résidus protéiques ou phénolés, a été appréciée par le rapport d'absorbance 260/280 nm. Tous les échantillons utilisés lors des expérimentations avaient des rapports compris entre 1,8 et 2 indiquant une pureté satisfaisante.

III. La réaction de transcription inverse

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) double brin à partir des ARNm est réalisée grâce à l'emploi du Reverse Transcription Core Kit[®] (EUROGENTEC S.A., Angers, France). La transcription inverse (RT) est réalisée à partir d'environ 1,5 µg d'ARN totaux contenus dans un volume de 6 µl de solution d'extraction auquel est ajouté 1,25 U/ml de transcriptase inverse (EuroScript RT[®]), 2,5 µM d'oligo d(T), 0,4 U/ml d'inhibiteur des ribonucléases, 5 mM de MgCl₂, et 500 µM de chaque dNTP, pour un volume final de 20 µl. Après une incubation de 10 min à 25 °C, puis 30 min à 48 °C, la transcriptase inverse est inactivée par la chaleur (5 min à 95 °C). Les solutions d'ADNc obtenues pour chaque échantillon sont diluées au 1/20 dans l'eau pour préparation injectable (PPI) et conservées à -20 °C jusqu'à utilisation.

IV. Amplification quantitative des ADNc cibles par PCR en temps réel

IV.1 Principe de la PCR en temps réel

L'objectif de nos expérimentations étant de connaître les variations du taux d'expression de plusieurs gènes, nous avons utilisé la technique de la *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* quantitative en temps réel (RT-qPCR). Cette technique repose sur la quantification relative du taux d'expression d'un gène cible par rapport à un ensemble de gènes de référence. Il s'agit donc ensuite de comparer les variations de ce rapport de taux d'expression aux différents temps étudiés.

Après l'étape de transcription inverse des ARNm en ADNc, une séquence nucléotidique spécifique est amplifiée à l'aide d'un couple d'amorces encadrant la région cible. Au cours de cette étape de qPCR, l'incorporation d'un fluorophore s'intercalant dans l'ADN double brin (SYBR Green[®]) permet la quantification et le suivi en temps réel de la quantité de produit d'amplification néoformé. En comparaison à la PCR classique, la technique utilisée permet le suivi en temps réel de la quantité d'ADNc amplifié. La réaction d'amplification est analysée par un logiciel de traitement des données (Lightcycler Software[®] v3.5) (Roche) qui, dans la phase exponentielle d'amplification, fournit pour chaque échantillon un *cycle de quantification* (Cq) caractéristique, inversement proportionnel à la concentration d'ADNc de l'échantillon. Les différences de Cq entre le gène cible et une combinaison de gènes de référence permettent, après calcul, de déterminer le taux d'ADNc du gène cible par rapport à la combinaison de gènes de référence.

L'utilisation d'une combinaison de gènes de référence permet de comparer les résultats d'une qPCR à l'autre, et de pouvoir déterminer le taux d'expression de plusieurs gènes dans un échantillon par rapport à leur expression dans un autre échantillon.

IV.2 Conception des amorces et optimisation des conditions de la qPCR

Les amorces ont été conçues pour recouvrir la frontière exon-intron afin d'empêcher l'amplification d'ADN génomique (Figure n° 60), à l'exception de SOCS3 qui ne comporte qu'un seul exon. La conception des amorces a été réalisée à l'aide du logiciel Mac Vector[®] (Accelrys, San Diego, USA) et les paramétrages ont été effectués afin de déterminer leur température de fusion et d'éviter leur dimérisation ainsi que leur « auto-amorçage ». La spécificité des amorces a été vérifiée par l'algorithme Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast.cgi>), puis elles ont été synthétisées par la société Eurogentec (Saraing, Belgique).

Afin d'optimiser chaque couple d'amorce, une gamme étalon diluée en série a été réalisée à partir d'une solution d'ADN recombinant spécifique sur une amplitude de 4 log afin d'encadrer les concentrations des futurs échantillons. L'ADN recombinant pur a été amplifié à partir d'amorces qui encadrent et dépassent la zone « d'accroche » du couple d'amorce d'intérêt. La pente de la droite obtenue permet de connaître l'efficacité (E) de l'amplification par qPCR selon la formule suivante : $E=10^{(-1/pente)}$. Une efficacité de qPCR de 100 % se traduit alors graphiquement par une pente de 3,32.

L'optimisation des amorces et le choix de la concentration finale utilisée pour chaque échantillon ont ensuite été déterminés par l'utilisation de dilutions d'un calibrateur expérimental. Celui-ci est composé d'un mélange des échantillons destinés à être analysés par la suite : il est donc représentatif de l'ensemble des échantillons analysés. Pour chaque point de gamme, les mesures ont été dupliquées. Chaque ADNc étant caractérisé par une température de fusion donnée, la vérification de la spécificité de l'amplification a été réalisée par comparaison des courbes de fusion obtenues après le dernier cycle d'amplification (Peinnequin et al., 2004). D'autre part, les produits d'amplification obtenus ont été contrôlés par électrophorèse haute résolution sur gel DNA Lab Chips[®] (Agilent technologies, USA).

Cette analyse permet de s'assurer de la présence d'un fragment d'amplification de taille unique et de vérifier que la taille du fragment obtenu est bien conforme à la taille du fragment attendu.

Les caractéristiques des couples d'amorces utilisés sont indiquées dans le Tableau n° 10.

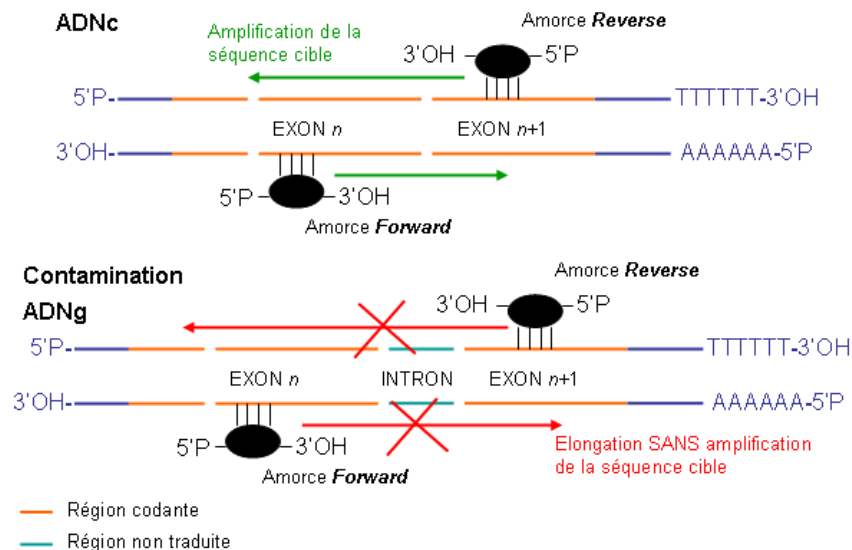


Figure n° 60 : Stratégie de dessin des amorces.

IV.3 Amplification quantitative de l'ADNc cible

La phase de qPCR a été réalisée à l'aide du kit LC FastStart DNA Master SYBR Green® Kit I (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne), en utilisant 2,5 ou 5 µl d'une matrice provenant d'une dilution du produit de RT, correspondant respectivement à 15 ou 30 ng d'ARN totaux. A cette matrice sont ajoutés avec 4 ou 5 mM de MgCl₂, 2 µl de Taq-SybrGreen®, 0,4 ou 0,5 µM de chaque amorce et une quantité d'eau stérile permettant d'arriver à un volume final de 20 µl. Les qPCR ont été réalisées en utilisant le Light Cycler® (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne). La qPCR est réalisée avec 60 cycles, composés chacun de 15 s à 95 °C, 4-5 s à la température spécifique d'anneau, 8 s à 72 °C.

Gène	Référence	Séquence 5'-3'	Taille amplicon (pb)	Temperature d'annelage (°C)
HPRT1	NM_013556	F CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC R GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	123	60
Ppia	NM_008907	F TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG R CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	127	58
ARBP	NM_007475	F GAAAATCTCCAGAGGCACCATTG R TCCCACCTTGTCTCCAGTCTTTATC	70	54
TBP	NM_011603	F CGGACAACCTGCGTTGATTTTCAG R GAAGCCCAACTTCTGCACAACCTC	117	56
IL-1 β	NM_008361	F GCTGAAAGCTCTCCACCTCAATG R TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTG	89	58
IL-6	NM_031168	F GAGGATACCACTCCCAACAGACC R AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	141	60
TNF α	NM_013693	F CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA R TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	175	60
SOCS-3	NM_007707	F CCAGCTCCAGCTTCTTTCAAGTG R GAGAGTCCGCTTGTCAAAGGTATTG	74	60
ICAM-1	NM_010493	F GGGCTGGCATTGTTCTCTAATGTC R GGATGGTAGCTGGAAGATCGAAAAG	70	59
VCAM-1	NM_011693	F TTGCCTCGCTAGGTTACACAGTG R ACCCAGATGGTGGTTTCCTTG	108	55
CXCL1	NM_008176	F AACATCCAGAGCTTGAAGGTGTTG R GACCATTCTTGAGTGTGGCTATGAC	79	57
CCL5	NM_013653	F GCCCTCACCATCATCCTCACT R CAGCTCTAGGGAGAGGTAGGCAAA	108	59
cPLA2 α	NM_008869	F ACAGCTCCGACAGTGATGATGAG R GGACCCCAACTTGCTTGGTTGTC	99	57
PLA2 IIE	NM_012044	F TGACCCCAAGCTGGAAAAGTACC R TCTTGTCACTCGCAGGTATGC	101	60
COX-2	NM_011198	F CCCCTTCTGCGAAGTTTAATC R AGGCTTCCCAGCTTTTGTAACC	110	53
hPGDS	NM_019455	F GACACGCTGGATGACTTCATGTC R GGTGCTTGATGTGTGAGCAATTC	98	56
mPGES-1	NM_022415	F GCACACTGCTGGTCATCAAGATGT R GGGGTTGGCAAAGCCTTCT	83	56

Tableau n° 10 : Caractéristiques des couples d'amorces utilisés pour l'amplification des ADNc par PCR en temps réel.

HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyl transferase ; Ppia : peptidylprolyl isomerase A ; ARBP, acidic ribosomal phosphoprotein ; TBP, TATA box Binding Protein ; IL-1 β , interleukine 1- β ; IL-6, interleukine 6 ; TNF α , tumor necrosis factor α ; SOCS-3, suppressor of cytokine signaling-3 ; ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1 ; VCAM-1, vascular adhesion molecule-1 ; CXCL1, keratinocyte-derived chemokine (ou KC) ; CCL5, C-C motif ligand 5 (ou RANTES) ; cPLA2 α , phospholipase-A2 cytosolique ; PLA2 IIE, phospholipase-A2 IIE ; COX-2, cyclo-oxygénase-2 ; hPGDS, prostaglandine-D synthase hématopoïétique ; mPGES-1, prostaglandine-E synthase microsomale.

Les conditions de qPCR ont été optimisées pour chaque gène à analyser en faisant varier les différents paramètres : température d'hybridation, concentration d'amorce, concentration en Mg^{2+} .

Après amplification, les Cq ont été calculés par le logiciel LightCycler[®] v.3.5 (Roche) par la méthode du maximum de la dérivée seconde. La quantification relative de l'ADNc présent dans chaque échantillon, correspondant à la valeur brute, 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

Différentes techniques permettent de limiter les variations expérimentales liées aux expérimentations de RT-qPCR. Chacune présente un certain nombre d'avantages et d'inconvénients, sans permettre de supprimer totalement les sources de variations expérimentales (Huggett et al. 2005). Une des principales méthodes consiste à ajouter un marqueur extérieur à l'échantillon avant les étapes d'extraction ou de RT (Gilsbach et al., 2006; Huggett et al., 2005), permettant ainsi de connaître l'efficacité des étapes de RT et de qPCR et de détecter d'éventuels phénomènes d'inhibition lors de la qPCR.

Le concept de gène de référence est la voie utilisée majoritairement afin de normaliser les données de qPCR. Les gènes de référence, comme les gènes d'intérêts analysés, sont affectés par tous les facteurs de variation durant le processus expérimental et jouent le rôle de contrôle interne.

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, en raison de la régulation des gènes référents dans certaines circonstances, il est indispensable de valider les gènes référents dans chaque condition expérimentale.

L'expression de chaque gène d'intérêt est alors exprimée par rapport à la moyenne géométrique de plusieurs gènes de référence dont l'absence de variabilité est validée sur nos échantillons par l'analyse geNorm. Cette méthode, développée par l'équipe de Vandesompele (Vandesompele et al. 2002), consiste à sélectionner les gènes de référence les plus stables, et à proposer l'utilisation de plusieurs gènes de référence pour le calcul d'un facteur de normalisation approprié. Le principe majeur est le suivant : le rapport d'expression de deux gènes stables devrait être constant au travers des échantillons. L'application Visual Basic pour Excel appelée geNorm[®] permet de déterminer les gènes de référence les plus stables, ainsi que le nombre de gènes de référence à utiliser. En raison du modèle mathématique utilisé, le nombre de gènes de référence utilisés ne peut être inférieur à 3. Au cours de nos différentes expérimentations, la normalisation a été validée par le logiciel en utilisant la moyenne géométrique de Ppia, HPRT1, TBP et ARBP pour le cortex, et Ppia, HPRT1 et TBP pour l'hippocampe.

Dosage protéique par analyses multiplexées - Technologie Luminex[®]

I. Extraction des protéines totales sur homogénats tissulaires

Les souris sont sacrifiées par décapitation. L'extraction du cerveau de la boîte crânienne est réalisée immédiatement, et les cerveaux sont placés sur un plan de travail réfrigéré. On réalise alors une microdissection et un prélèvement du cortex total, d'une part, ainsi que des hippocampes, d'autre part (Figure n° 58). Les structures sont pesées et immédiatement congelées et conservées à -80 °C. Les échantillons, constitués des 2 hippocampes et d'un hémicortex, sont traités d'après un protocole adapté de Husle et al. (2004). Chaque structure est broyée respectivement dans 0,5 ml et 1,0 ml de tampon de broyage (inclus dans le Cell Lysis Kit[®], Bio-Rad Life Science Group, Marnes-la-Coquette, France) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (inclus dans le Cell Lysis Kit[®], Bio-Rad Life Science Group) et 3 µl d'une solution à 500 mM de fluorure de phenylméthylsulfonyl dans du diméthylsulfoxyde, tous deux produits par Sigma (L'Isle-d'Abeau Chesnes, France). Les échantillons sont alors homogénéisés à +4 °C à l'aide d'un broyeur Polytron PT3100 (Fischer Scientific, Illkirch, France), par quatre impulsions de courte durée. Ils sont ensuite centrifugés à 4.500 g pendant 15 min à +4 °C. Enfin est effectuée la collecte du surnageant de chaque échantillon, immédiatement congelé et conservé à -80 °C avant analyse.

II. Dosage des protéines totales

La concentration en protéines totales de chaque échantillon est déterminée par la méthode de PIERCE/BCA (acide bicinchoninique) en utilisant un système de dosage BCA (Protein Assay Kit[®], Interchim, Illkirch, France). L'ensemble des dosages est réalisé en double exemplaire et la valeur retenue pour l'analyse des données correspond à la valeur moyenne des deux résultats.

III. Dosage des protéines par la technologie Luminex[®]

Les échantillons sont dilués avec le tampon de broyage pour obtenir une concentration finale de 1 mg/ml. Ils sont ensuite analysés à l'aide de la technologie Luminex[®] qui, fondée sur le principe de la cytométrie en flux, allie l'utilisation de microsphères fluorescentes et une double lecture après excitation par deux lasers. Deux kits de dosage ont été utilisés, permettant la détection des cytokines et chimiokines IL-1 β , IL-6, TNF α , CXCL1 et CCL5 (Bio-Rad Life Science Group), et la détection des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 (Millipore Linco Biosciences Division, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Pour chaque échantillon, les analyses sont réalisées en double exemplaire et la valeur retenue pour l'analyse des données correspond à la valeur moyenne des deux résultats. La quantité de chaque marqueur recherché est exprimée en pg/mg de protéines totales.

Mesure de l'activité enzymatique COX totale et PLA2 totale

I. Extraction des protéines sur homogénats tissulaires

Les souris sont anesthésiées par une dose de pentobarbital sodique (80 mg/kg i.p. ; Ceva Santé Animale, Libourne, France), puis perfusées par voie intracardiaque à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex[®], Illkirch, France). La perfusion est réalisée par insertion dans la crosse aortique d'une canule de perfusion en passant par le ventricule gauche, l'incision de l'oreillette droite permettant l'évacuation du sang puis du liquide circulant. Le liquide perfusé est une solution de tampon Tris à pH 7,4, contenant 0,16 mg/ml d'héparine, afin d'éliminer les cellules sanguines susceptibles de participer aux activités globales. Après décapitation, les structures cérébrales d'intérêt (cortex et hippocampe) sont prélevées et congelées rapidement à -80 °C. Les tissus sont ensuite décongelés et broyés dans 10 ml/g de tissu d'une solution tampon (50 mM HEPES, pH 7,4, 1 mM EDTA) conservée dans la glace contenant un détergent (Nonidet P-40 0,4 %) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Leupeptine 1 µl/ml, Pepsatine 1 µl/ml ; Sigma, L'Isle-d'Abeau Chesnes, France). Après centrifugation à 10 000 g pendant 15 min à +4 °C, le surnageant est prélevé et congelé à -80 °C.

II. Dosage des protéines totales par la méthode BCA

La concentration en protéines totales de chaque échantillon est déterminée comme indiqué précédemment.

III. Mesure des activités enzymatiques

III.1 Mesure de l'activité enzymatique PLA2 totale

La phospholipase A₂ est une enzyme responsable de la formation d'AA après hydrolyse de la liaison ester en position 2 des phospholipides membranaires. Une mesure de l'activité enzymatique de PLA2 totale est réalisée sur les surnageants prélevés à l'aide du kit cPLA2 Assay Kit[®] (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Un substrat synthétique, l'arachidonoyl Thio-PC, est utilisé pour détecter l'activité phospholipase (Reynolds et al. 1994) par l'hydrolyse de la liaison ester en position de l'arachidinoyl thioester. La molécule libérée avec un groupement thiol est mise en évidence par le DTNB (5,5'-dithio-bis(2-acide nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman, qui donne un mélange contenant l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (TNB) dont la quantification est réalisée par mesure de l'absorbance à 414 nm.

Chaque échantillon fait l'objet de trois mesures d'absorbance, dans trois puits différents. Le bruit de fond est mesuré dans deux puits contenant l'ensemble des réactifs, sans les échantillons à doser. La valeur retenue pour l'analyse des données est la moyenne des valeurs d'activité obtenue pour chaque type de mesure. Pour chaque échantillon, la soustraction de la valeur d'absorbance moyenne du bruit de fond, à la valeur d'absorbance moyenne retenue, permet de déterminer une différence d'absorbance ΔA_{414} . De ce calcul, on obtient la valeur de l'activité PLA2 totale, exprimée en quantité d'enzyme permettant l'hydrolyse de 1 μmol d'arachidonoyl Thio-PC par minute à 25 °C. L'activité enzymatique, rapportée à la concentration de protéines totales et au volume d'échantillon utilisé, est exprimée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines totales.

III.2 Mesure de l'activité enzymatique COX totale

La cyclo-oxygénase COX est une enzyme bifonctionnelle possédant à la fois des activités peroxydase et cyclo-oxygénase.

L'activité cyclo-oxygénase transforme l'AA en hydroperoxy-endoperoxyde (prostaglandine G₂, PGG₂) et l'activité peroxydase réduit l'endoperoxyde en l'alcool correspondant (prostaglandine H₂, PGH₂), précurseur des prostaglandines, thromboxanes et prostacyclines. Nous avons réalisé une mesure de l'activité enzymatique totale correspondant aux deux isoformes COX-1 et COX-2.

La mesure de l'activité enzymatique COX totale est réalisée sur les surnageants prélevés, à l'aide du kit COX Activity Assay[®] (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Ce coffret permet la mesure de l'activité peroxydase des deux isoformes de la COX en calculant la quantité de N,N,N',N'-tétraméthyl-*p*-phénylènediamine (TMPD) oxydée à 25 °C, par minute et par ml d'échantillon (Kulmacz et Lands 1983). L'évaluation est réalisée par colorimétrie en mesurant l'absorbance des échantillons à 590 nm.

Chaque échantillon fait l'objet de trois mesures d'absorbance, dans trois puits différents. Par ailleurs, chaque échantillon est dosé en double exemplaire après inactivation par la chaleur afin de déterminer la valeur du bruit de fond de l'absorbance à 590 nm pour chaque échantillon. La valeur retenue pour l'analyse des données est la moyenne des valeurs d'activité obtenues pour chaque type de mesure. Pour chaque échantillon, la soustraction de la valeur d'absorbance moyenne du bruit de fond, à la valeur d'absorbance moyenne retenue, permet de déterminer une différence d'absorbance ΔA_{590} . De ce calcul, on obtient la valeur de l'activité COX totale, exprimée en quantité d'enzyme permettant l'oxydation de 1 nmol de TMPD par minute. L'activité enzymatique, rapportée à la concentration de protéines totales et au volume d'échantillon utilisé, est exprimée en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de protéines totales.

Histologie et immunohistochimie

I. Préparation des tissus perfusés : fixation et prélèvement des cerveaux

Les souris sont anesthésiées par une dose de pentobarbital sodique (80 mg/kg i.p. ; Ceva Santé Animale, Libourne, France), puis perfusées par voie intracardiaque à l'aide de 30 ml de sérum physiologique hépariné à 5 UI/ml, à la vitesse de 5 ml/min afin d'obtenir une exsanguination de l'animal. La fixation des tissus est ensuite réalisée par la perfusion d'un volume de 30 ml d'une solution de formaldéhyde acétique à 4 % dans du sérum physiologique. À la fin de la perfusion, les animaux sont conservés à 4 °C pendant une période de 2 h, avant extraction des cerveaux entiers de la boîte crânienne.

Les cerveaux sont ensuite précoupés légèrement en amont des deux zones d'intérêt, à l'aide d'une lame de rasoir et d'un gabarit adapté (\pm bregma 1.3 (Figure n° 61-a) et \pm bregma -1.5 (Figure n° 61-b) (Franklin et Paxinos 2001) afin de faciliter la coupe ultérieure.

Les deux blocs obtenus pour chaque cerveau sont ensuite placés dans une solution de post-fixation de formaldéhyde 4 % pendant 24 h.

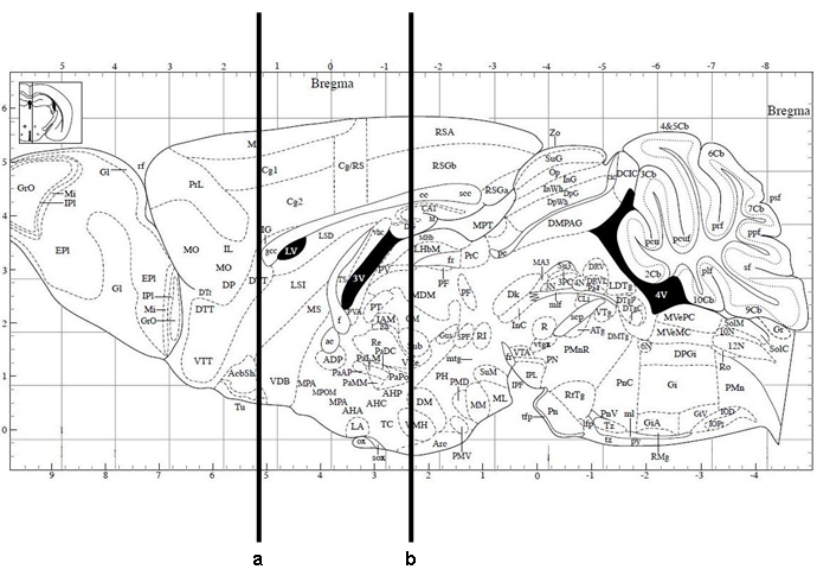


Figure n° 61 : Plan de précoupes du cerveau suivant les axes : bregma 1,3 (a) et -1,5 mm (b). D'après Franklin et Paxinos (2001).

Les blocs sont rincés une nuit complète sous l'eau courante, puis déshydratés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes, puis de butanol, avant d'être inclus en paraffine Histomed[®] standard, (Labo-Moderne, Paris, France) à l'aide de trois bains successifs à la température de 58-60°C. Enfin, ils sont inclus dans des cassettes de taille adaptée.

Les blocs sont alors tranchés en coupes frontales sériées de 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (Leica[®], Wetzlar, Allemagne). Celles-ci sont déposées sur des lames « silanisées » (prétraitement au 3-aminopropyl-triéthoxysilane à 2 %) favorisant leur adhérence, à raison de trois coupes par lame.

Les plans de coupe permettant d'observer les zones habituellement lésées lors de l'intoxication par le soman ont été choisis en référence à l'axe rostro-caudal d'après Franklin et Paxinos (Franklin et Paxinos 2001) :

- bregma 0,5 mm / 1,10 mm : septum, striatum, cortex piriforme,
- bregma -1,7 mm / -2,18 mm : amygdale, thalamus et hippocampe.

II. Détections histochimiques

II.1 Traitement des coupes paraffinées

Les coupes paraffinées fixées sur les lames silanisées sont déparaffinées puis réhydratées. Préalablement aux études histochimiques et immunohistochimiques, elles sont successivement passées dans des bains de toluène ainsi que dans des bains d'alcool de titre décroissant.

II.2 Coloration à l'hémalun-phloxine

Après réhydratation, les coupes sont colorées par passage des lames durant 3 min dans l'hémalun (hématéine 0,2 % (Sigma-Aldrich[®], Lyon, France), alun de potassium 5 %, acide acétique 2 %). Les lames sont ensuite rincées à l'eau claire, différenciées dans l'alcool acide (alcool 95 % ; HCl 0,15 %), lavées 5 min à l'eau claire puis colorées à la phloxine (3 %) pendant 10 secondes et rincées à l'eau claire.

L'hématéine colore spécifiquement les noyaux cellulaires en bleu-violet. Les cellules dont le pH cytoplasmique diminue, traduisant une souffrance cellulaire, se colorent en rose-rouge en raison des propriétés acidophiles de la phloxine. Cette double coloration permet la visualisation des événements neurodégénératifs et de l'œdème cérébral avec un repérage précis des zones de coupe à l'aide de l'atlas Franklin et Paxinos (Franklin et Paxinos 2001).

II.3 Détection histochimique des cellules microgliales

Les cellules microgliales sont marquées par l'isoelectine IB4 provenant de *Griffonia simplicifolia*, marquée à la peroxydase (GSA-IB4, Ref L5391, Sigma-Aldrich, Lyon, France), d'après un protocole adapté de Streit et Kreutzberg (1987). Les coupes sont 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 CaCl₂, MgCl₂ et MnCl₂ (0,1 nM chacun). Les lames sont ensuite rincées dans un tampon phosphate (3 fois 5 min) puis révélées par une solution de diaminobenzidine (DAB). La réaction est stoppée par immersion des coupes dans l'eau distillée.

II.4 Détection 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 % (Na₂S, 9H₂O/NaH₂PO₄, H₂O ;

pH~2) puis avec une solution de formaldéhyde acétique à 4 % dans du sérum physiologique (30 ml). Après leur réalisation (voir p. 281), 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 et dans l'obscurité, pendant 50 min. Les coupes ont ensuite été rincées 2 fois 5 min dans l'eau distillée.

III. Détections immunohistochimiques

Après réhydratation, les coupes sont incubées 10 min à température ambiante dans un tampon Tris salin (TBS ; NaCl 0,15 M et Tris-HCl 0,1 M, pH=7,5) contenant 0,3 % de H₂O₂ afin d'éliminer les peroxydases endogènes. Les coupes sont ensuite incubées 2 fois 15 min dans du TBS-T (TBS contenant 0,05 % de Tween 20). Après saturation des sites non spécifiques dans le TBST-TS (TBS-T contenant 1,5 % de sérum de chèvre) pendant 1 h à température ambiante, les coupes sont incubées toute la nuit à +4 °C avec l'anticorps primaire dans le TBS-T en chambre humide. Après deux rinçages de 5 min chacun dans du TBS-T, elles sont traitées avec l'anticorps secondaire approprié conjugué à la biotine dans le TBS-T pendant 30 min à température ambiante. Les coupes sont alors incubées 30 minutes à température ambiante en présence du complexe avidine-biotine-peroxydase dilué à 4 % dans du TBS-T (kit Vectasain[®] Elite ABC ; Vector Laboratories, Burlingam, États-Unis), puis rincées 2 fois 5 min dans du TBS-T. La révélation est finalement réalisée par l'incubation des coupes dans une solution de 3',3-DAB (SigmaFast[®] ; Sigma-Aldrich, Lyon, France) pendant un temps variable suivant les expérimentations (quelques minutes), contenant 0,08 % de H₂O₂ dilué à 30 %. La réaction est stoppée par rinçage dans de l'eau distillée. Après les différents traitements, les coupes sont déshydratées dans des bains d'éthanol de concentrations

croissantes, puis de toluène. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle avec de l'histolaque et séchées à l'étuve (37 °C).

Seule la recherche des GNN a nécessité de procéder au préalable à un démasquage des sites antigéniques. Les coupes réhydratées sont placées dans une solution de démasquage (Vector Laboratories, Burlingam, États-Unis). Le démasquage s'effectue à environ 120 °C, sous pression (autocuiseur) pendant 3 min.

Pour les anticorps nécessitant une mise au point, des contrôles positifs ont été réalisés en utilisant des coupes en paraffine de tissus exprimant naturellement l'antigène recherché (hPGDS : rate ; mPGES-1 : intestin).

Afin de vérifier l'absence de liaison non spécifique de l'anticorps secondaire, les marquages ont été réalisés sur quelques coupes dans les mêmes conditions expérimentales mais sans incubation avec l'anticorps primaire.

Les anticorps primaires et secondaires sont listés dans le Tableau n° 11.

Antigène	Source	Dilution	Procédure	Fournisseur, références
Anticorps primaires				
GFAP	Polyclonal Lapin Antivache	1/2000	Déparaffinage simple	Dako ; Réf. : Z00334
Granulocytes neutrophiles	Monoclonal Rat Antisouris (Clone 7/4)	1/100	Déparaffinage + Démasquage antigénique	AbD serotec ; Réf. : MCA771G
cPLA2α	Polyclonal Lapin Antisouris	1/50	Déparaffinage simple	Santa-Cruz ; Réf. : sc-216
COX-2	Polyclonal Lapin Antisouris	1/200	Déparaffinage simple	Alexis ; Réf. : ALX-210-711
mPGES-1	Polyclonal Lapin Antisouris	1/50	Déparaffinage simple	Cayman Chemicals ; Réf. : 160140
hPGDS	Monoclonal Rat Anti-humain et anti-souris (Clone 7H4)	1/50	Déparaffinage simple	Cayman Chemicals ; Réf. : 10004349
Anticorps secondaires conjugués à la biotine				
Anti-IgG de rat (Souris-adsorbé)	Lapin	1/50		Vector ; Réf. : BA-4001
Anti-IgG de lapin	Chèvre	1/200		Vector ; Réf. : PK 6101

Tableau n° 11 : Liste des anticorps utilisés pour les détections immunohistochimiques.

IV. Méthode d'évaluation chiffrée de l'intensité des dommages cellulaires et de l'activation gliale

Chaque coupe a fait l'objet d'une observation initiale au microscope de laboratoire (Leica), afin de s'assurer de l'homogénéité des colorations ou des marquages sur les trois coupes sériées présentes sur chaque lame. Par la suite, les analyses ont été réalisées sur une des trois coupes. Les régions étudiées sont repérées à l'aide d'un atlas stéréotaxique (Franklin et Paxinos 2001).

IV.1 Dommmages cellulaires

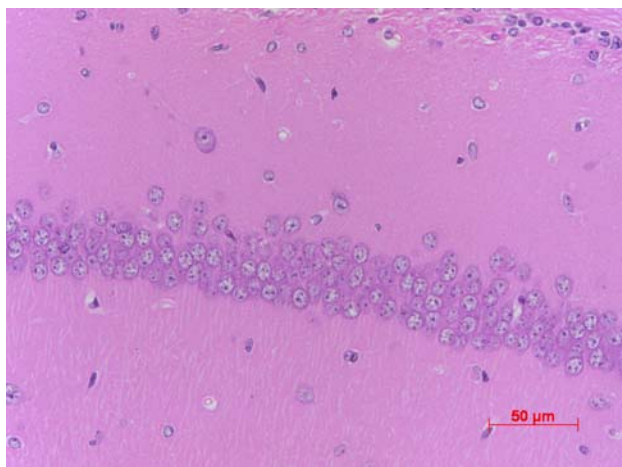
Les dommages cellulaires ont été évalués par une technique semi-quantitative par examen des lames colorées à l'H&P.

Le principe général de notre quantification repose sur la détermination d'un score lésionnel pour chaque structure cérébrale en fonction du nombre de cellules éosinophiles comptabilisées rapporté au nombre total de cellules dans la structure considérée. L'attribution du score a été réalisée par deux lectures successives par le même expérimentateur, à 30 jours d'intervalle. Les deux lectures ont donné des résultats identiques. Un 2^e expérimentateur a réalisé une lecture indépendante afin de valider les scores initialement attribués.

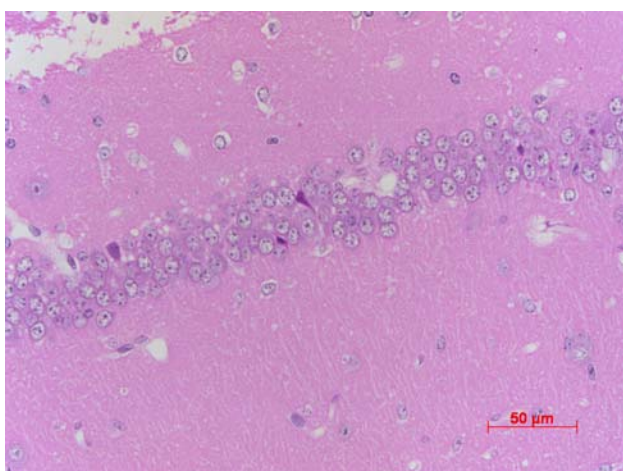
Nous avons tout d'abord déterminé le nombre total de cellules dans les différentes structures étudiées chez les animaux témoins. Nous avons ensuite comptabilisé, pour chaque animal, le nombre de cellules éosinophiles dans l'ensemble de chaque structure étudiée. Ce décompte nous a permis de déterminer le pourcentage de cellules éosinophiles rapporté au nombre total de cellules comptabilisées chez un animal témoin, et d'attribuer un score pour chaque structure observée, selon le barème suivant : 0 : absence de cellules éosinophiles ; 1 : 1-10 % ; 2 : 11-25 % ; 3 : 26-45 % ; 4 : >45 %. Un exemple de niveau de lésion correspondant à chaque score est illustré sur la Figure n° 62 pour la zone CA1.

Au temps d'étude 7 j, le nombre de cellules éosinophiles diminue en raison de la mort d'un certain nombre d'entre elles. Pour l'étude concernant l'évaluation des effets des combinaisons KET/SA, un score lésionnel global a été attribué à chaque animal grâce à la moyenne des scores attribués dans les 5 régions présentant le maximum de lésions chez les animaux du groupe TÉMOIN SOMAN (septum latéral, cortex piriforme, amygdale, CA1 et CA3). Les résultats ont été exprimés par la moyenne \pm ES des scores individuels.

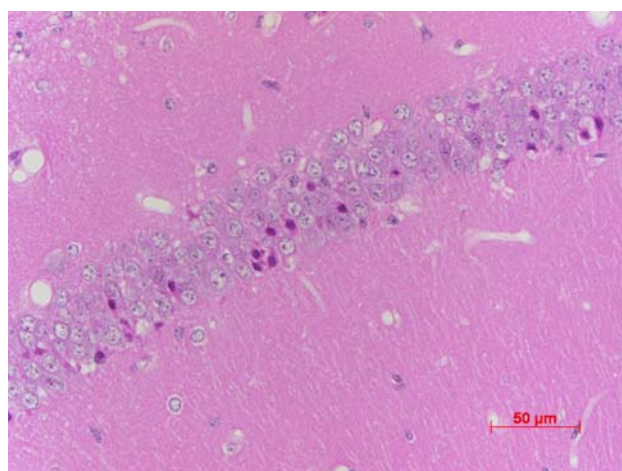
Score 0



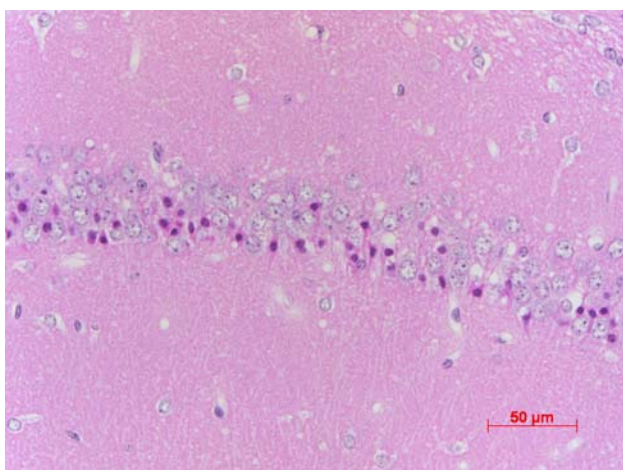
Score 1



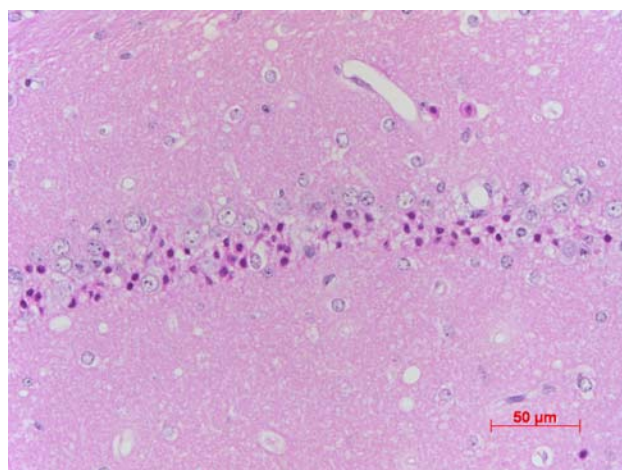
Score 2



Score 3



Score 4



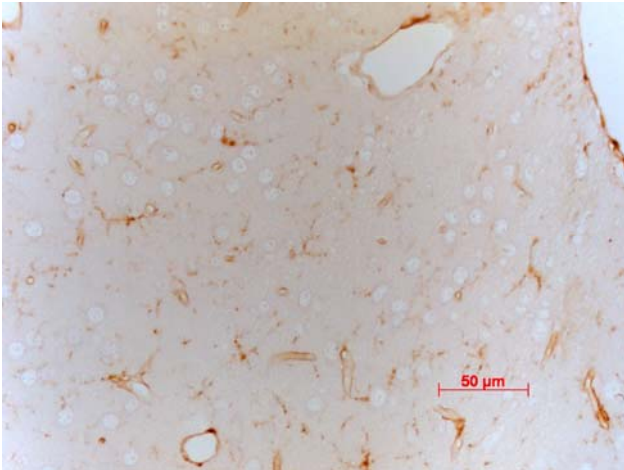
CA1

Figure n° 62 : Évaluation semi-quantitative des dommages cellulaires après coloration H&P après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 µg/kg ; s.c.). Le score final est obtenu par détermination du pourcentage de cellules éosinophiles rapporté au nombre total de cellules visibles chez un animal témoin : 0 : absence de cellules éosinophiles ; 1 : 1-10 % ; 2 : 11-25 % ; 3 : 26-45 % ; 4 : >45 %. Exemple de la région CA1.

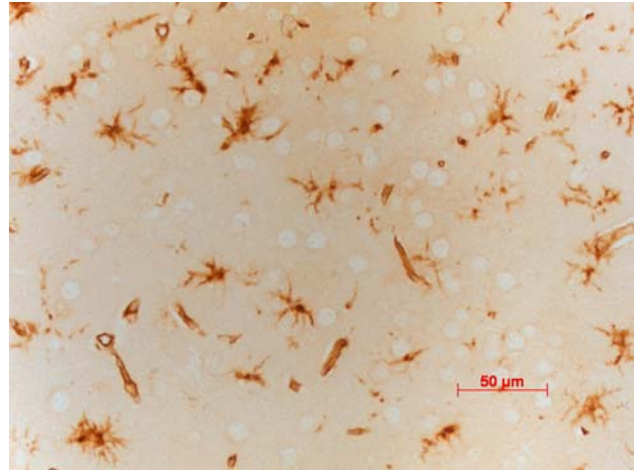
IV.2 Activation microgliale

Les niveaux d'activation ont été déterminés pour chaque animal et pour chaque région étudiée en considérant les modifications morphologiques des cellules microgliales observées. Une évaluation semi-quantitative a été réalisée par l'attribution pour chaque zone observée d'un score variant de 0 à 3, selon les modifications morphologiques caractérisant les niveaux croissants d'activation microgliale, tels qu'ils ont été décrits par Streit et al. (1999) et illustrés par la Figure n° 63 ; 0 : microglie quiescente ; 1 : présence d'une majorité de cellules microgliales hyper-ramifiées ; 2 : présence d'une majorité de cellules microgliales activées ; 3 : présence d'une majorité de cellules microgliales amiboïdes.

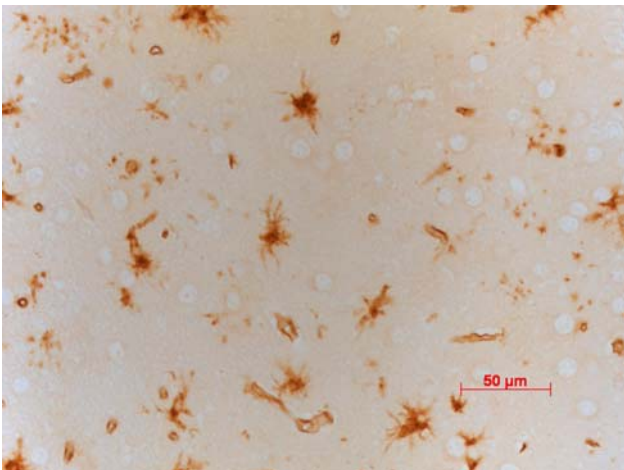
Score 0



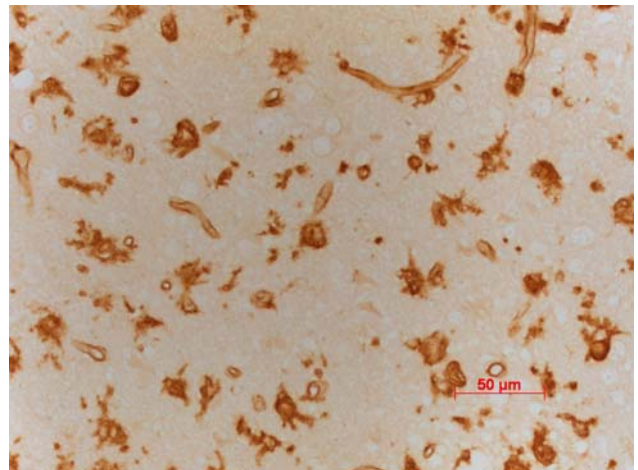
Score 1



Score 2



Score 3



CA1

Figure n° 63 : Evaluation semi-quantitative de l'activation microgliale par marquage histochimique par la GSA-IB4 après prétraitement HI-6 (50 mg/kg ; i.p.) et intoxication par une dose convulsivante de soman (172 μg/kg ; s.c.).

Le score final est obtenu en fonction du stade d'activation des cellules microgliales dans chaque structure étudiée : 0 : microglie quiescente ; 1 : présence d'une majorité de cellules microgliales hyper-ramifiées ; 2 : présence d'une majorité de cellules microgliales activées ; 3 : présence d'une majorité de cellules microgliales amoiboïdes.

IV.3 Activation astrocytaire

L'activation astrocytaire a été déterminée en prenant en considération le nombre de cellules exprimant GFAP, et l'augmentation de la taille de ces cellules. Ces paramètres ont été évalués, pour chaque structure observée, par la mesure de l'aire occupée par les cellules exprimant le marquage GFAP, rapportée à l'aire de la surface totale considérée. Les photomicrographies ont été acquises à l'aide d'un microscope Zeiss AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) et analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Zeiss AxioVision® software) (Figure n° 65). Les images ont été capturées à l'aide du logiciel d'analyse d'image, en conservant les mêmes réglages pour toutes les prises de vue. Le niveau de positivité du marquage de la GFAP a été défini lors du paramétrage du logiciel par la détermination d'un niveau de seuillage initial qui a été conservé pour l'ensemble de l'analyse. Chaque structure analysée a été délimitée manuellement, pour chaque cliché, comme le montre la Figure n° 64.

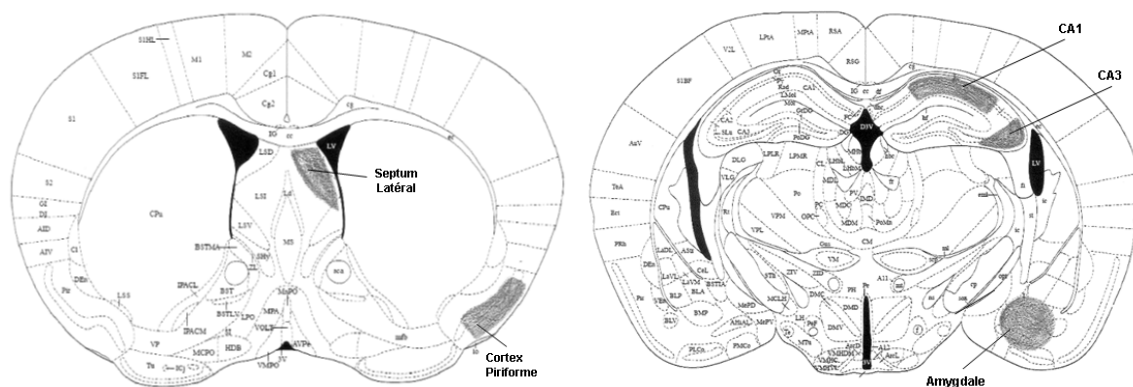


Figure n° 64 : Délimitation des structures pour la quantification du marquage GFAP lors de l'analyse d'image.

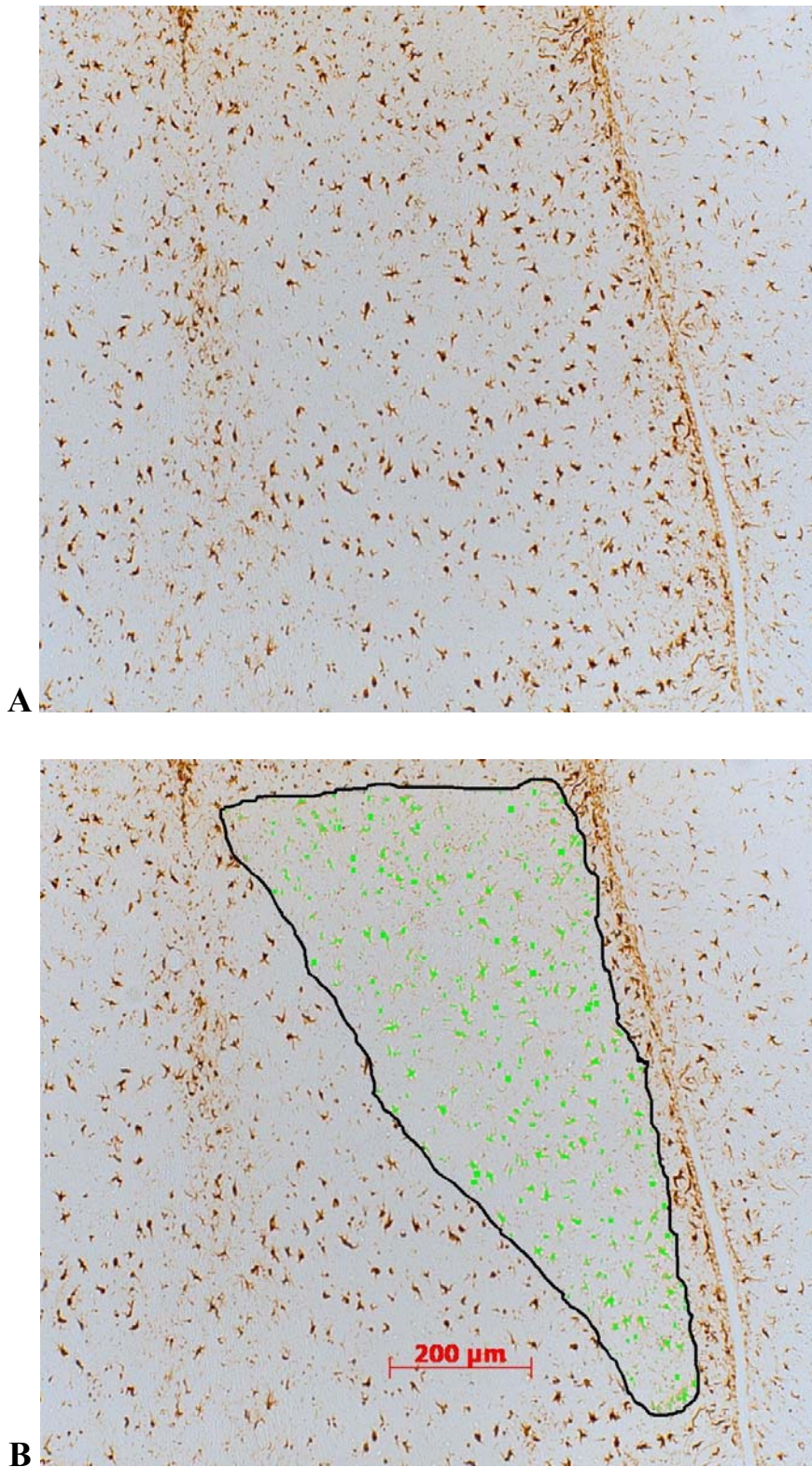


Figure n° 65 : Exemple de quantification du marquage de la protéine GFAP par analyse d'image dans le septum latéral.

A : Révélation immunohistochimique de GFAP ; B : Analyse d'image : les zones marquées par GFAP apparaissent en vert ; le logiciel permet le calcul du rapport surface marquée/surface totale de la zone délimitée.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica[®] 7.0 (Statsoft, Paris, France).

La comparaison statistique des différents lots d'animaux a été réalisée suivant le même principe pour les valeurs de score des dommages cellulaires (H&P), de score d'activation microgliale (GSA-IB4), de pourcentage de la surface couverte par GFAP, de quantification des ARNm par RT-qPCR, de quantification des protéines dosées par Luminex[®] et d'activité enzymatique. Une comparaison globale des différents lots a été réalisée par un test de Kruskal-Wallis, équivalent non paramétrique de l'analyse de la variance (ANOVA : *analysis of variance*). Si nécessaire, une comparaison des lots 2 à 2 a alors été effectuée par le test *post hoc* de Mann-Whitney, avec correction de Bonferroni. Pour tenir compte de l'augmentation rapide et incontrôlée du risque de première espèce lors des comparaisons multiples, pour un risque α donné, les probabilités ont été comparées en prenant α/k où k désigne le nombre de comparaisons effectuées 2 à 2.

Pour l'analyse de la perte de masse corporelle, la valeur de l'aire sous la courbe (*aire sous la courbe*, ASC) a été calculée pour chaque animal inclus dans les analyses à l'aide du logiciel SigmaPlot[®] (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Le nombre d'animaux inclus dans le suivi de poids étant très différent pour les temps d'étude allant jusqu'à 48 h ou 7 j, nous avons réalisé deux mesures de l'ASC pour ces deux durées d'expérimentation.

La comparaison statistique ASC des différents lots d'animaux, à 48 h et à 7 j, a été réalisée en tenant compte du nombre d'animaux inclus dans chaque lot expérimental et du nombre de lots à comparer :

Pour la comparaison de deux lots composés chacun d'un nombre d'animaux supérieur à 30, nous avons utilisé un test t.

Pour la comparaison de plusieurs lots, dont la taille était supérieure à 30, nous avons réalisé une comparaison globale des différents lots par une ANOVA, suivie si nécessaire d'une comparaison de chaque lot par rapport au lot témoins par un test post-hoc de Dunnett.

Pour la comparaison de plusieurs lots, dont la taille était inférieure à 30, nous avons procédé comme décrit précédemment, par un test de Kruskal-Wallis suivi si nécessaire d'une comparaison des lots 2 à 2 par un test post-hoc de Mann-Whitney, avec correction de Bonferroni.

Dans le cas des lots témoins, les analyses statistiques ont été réalisées en deux étapes. Ceux-ci ont été regroupés en un unique lot témoin si aucune différence statistique n'était mise en évidence pour les paramètres testés. Par la suite, ce lot témoin unique a été utilisé pour réaliser les comparaisons avec les différents lots expérimentaux.

Bibliographie

- Adams J, Collaco-Moraes Y, de Belleruche J. 1996. Cyclooxygenase-2 induction in cerebral cortex: an intracellular response to synaptic excitation. *J Neurochem* 66: 6-13.
- Adams J, Bauer R, Gebhardt B, Menke W, Baltes-Gotz B. 1994. Total i.v. anesthesia with S-(+)-ketamine in orthopedic geriatric surgery. Endocrine stress reaction, hemodynamics and recovery. *Anaesthesist* 43: 92-100.
- Adibhatla RM, Hatcher JF. 2007. Secretory phospholipase A2 IIA is up-regulated by TNF-alpha and IL-1alpha/beta after transient focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 1134: 199-205.
- Adibhatla RM, Hatcher JF. 2008. Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. *BMB Rep* 41: 560-567.
- Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. 2006. Lipids and lipidomics in brain injury and diseases. *AAPS J* 8: E314-321.
- Akarsu ES, Mamuk S, Comert A. 1998. Inhibition of pentylentetrazol-induced seizures in rats by prostaglandin D2. *Epilepsy Res* 30: 63-68.
- Akiba S, Sato T. 2004. Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. *Biol Pharm Bull* 27: 1174-1178.
- Albanese J, Garnier F, Bourgoin A, Leone M. 2004. The agents used for sedation in neurointensive care unit. *Ann Fr Anesth Reanim* 23: 528-534.
- Alexander WS. 2002. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2: 410-416.
- Allan SM, Rothwell NJ. 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2: 734-744.
- Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. 2005. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* 5: 629-640.
- Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36: 165-179.
- Aminoff MJ, Simon RP. 1980. Status epilepticus. Causes, clinical features and consequences in 98 patients. *Am J Med* 69: 657-666.
- Anderl JL, Redpath S, Ball AJ. 2009. A neuronal and astrocyte co-culture assay for high content analysis of neurotoxicity. *J Vis Exp*.

Anderson CM, Swanson RA. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1-14.

Andreasson KI, Savonenko A, Vidensky S, Goellner JJ, Zhang Y, Shaffer A, Kaufmann WE, Worley PF, Isakson P, Markowska AL. 2001. Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J Neurosci* 21: 8198-8209.

Angoa-Perez M, Kreipke CW, Thomas DM, Van Shura KE, Lyman M, McDonough JH, Kuhn DM. 2010. Soman increases neuronal COX-2 levels: Possible link between seizures and protracted neuronal damage. *Neurotoxicology*.

Anthonsen MW, Solhaug A, Johansen B. 2001. Functional coupling between secretory and cytosolic phospholipase A2 modulates tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-induced NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 276: 30527-30536.

Apland JP, Aroniadou-Anderjaska V, Braga MF. 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 ED, Perea G, Arellano JI, Buno W. 2002. Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22: 2443-2450.

Araujo IM, Xapelli S, Gil JM, Mohapel P, Petersen A, Pinheiro PS, Malva JO, Bahr BA, Brundin P, Carvalho CM. 2005. Proteolysis of NR2B by calpain in the hippocampus of epileptic rats. *Neuroreport* 16: 393-396.

Aroniadou-Anderjaska V, Figueiredo TH, Apland JP, Qashu F, Braga MF. 2009. Primary brain targets of nerve agents: the role of the amygdala in comparison to the hippocampus. *Neurotoxicology* 30: 772-776.

Arundine M, Tymianski M. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34: 325-337.

Auvin S, Mazarati A, Shin D, Sankar R. 2010. Inflammation enhances epileptogenesis in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 40: 303-310.

Avanzini G, Franceschetti S. 2003. Cellular biology of epileptogenesis. *Lancet Neurol* 2: 33-42.

Avignone E, Ulmann L, Levavasseur F, Rassendren F, Audinat E. 2008. Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. *J Neurosci* 28: 9133-9144.

Baba H, Nakahira K, Morita N, Tanaka F, Akita H, Ikenaka K. 1997. GFAP gene expression during development of astrocyte. *Dev Neurosci* 19: 49-57.

- Baik EJ, Kim EJ, Lee SH, Moon C. 1999. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. *Brain Res* 843: 118-129.
- Baille-Le Crom V, Collombet JM, Burckhart MF, Foquin A, Pernot-Marino I, Rondouin G, Lallement G. 1996. Time course and regional expression of C-FOS and HSP70 in hippocampus and piriform cortex following soman-induced seizures. *J Neurosci Res* 45: 513-524.
- Baille-Le Crom V, Collombet JM, Carpentier P, Brochier G, Burckhart MF, Foquin A, Pernot-Marino I, Rondouin G, Lallement G. 1995. Early regional changes of GFAP mRNA in rat hippocampus and dentate gyrus during soman-induced seizures. *Neuroreport* 7: 365-369.
- Baille V, Clarke PGH, Brochier G, Dorandeu F, Verna JM, Four E, Lallement G, Carpentier P. 2005. Soman-induced convulsions: The neuropathology revisited. *Toxicology* 215: 1-24.
- Ballough G, Kan R, Fath D, Tompkins C, Misuro S, Filbert M. 2006. Neuroprotection following nerve agent-induced seizures, a comparison of combined treatment efficacies : dantrolen-diazepam vs. ketamine-diazepam. Paper presented at 15th Biosci. Med. Def. Rev., Hunt Valley, MD, USA.
- Balosso S, Ravizza T, Perego C, Peschon J, Campbell IL, De Simoni MG, Vezzani A. 2005. Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Ann Neurol* 57: 804-812.
- Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA. 2002. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* 531: 2-6.
- Barres BA, Barde Y. 2000. Neuronal and glial cell biology. *Curr Opin Neurobiol* 10: 642-648.
- Barsante MM, Cunha TM, Allegretti M, Cattani F, Policani F, Bizzarri C, Tafuri WL, Poole S, Cunha FQ, Bertini R, Teixeira MM. 2008. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol* 153: 992-1002.
- Bartfai T, Sanchez-Alavez M, Andell-Jonsson S, Schultzberg M, Vezzani A, Danielsson E, Conti B. 2007. Interleukin-1 system in CNS stress: seizures, fever and neurotrauma. *Ann N Y Acad Sci*.
- Baskys A, Liwei F, Fang L, Ildar B, Bayazitov I. 2005. Activation of neuroprotective pathways by metabotropic group I glutamate receptors: a potential target for drug discovery? *Ann N Y Acad Sci*. 1053: 55-73.
- Basu A, Krady JK, Levison SW. 2004. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res* 78: 151-156.
- Baulac M. 2002. New antiepileptic drugs: new therapeutic options. *Rev Neurol (Paris)* 158: 4S46-54.

Baulac M, Arzimanoglou A, Semah F, Cavalcanti D. 1997. Therapeutic options provided by new antiepileptic drugs. *Rev Neurol (Paris)* 153: 21-33.

Baum VC, Tecson ME. 1991. Ketamine inhibits transsarcolemmal calcium entry in guinea pig myocardium: direct evidence by single cell voltage clamp. *Anesth Analg* 73: 804-807.

Baze WB. 1993. Soman-induced morphological changes: an overview in the non-human primate. *J Appl Toxicol* 13: 173-177.

Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC. 2002. Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295: 2282-2285.

Bechmann I, Galea I, Perry VH. 2007. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol* 28: 5-11.

Bennett JA, Dingledine R. 1995. Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron* 14: 373-384.

Benowitz NL, Simon RP, Copeland JR. 1986. Status epilepticus: divergence of sympathetic activity and cardiovascular response. *Ann Neurol* 19: 197-199.

Bensadoun JC, de Almeida LP, Dreano M, Aebischer P, Deglon N. 2001. Neuroprotective effect of interleukin-6 and IL6/IL6R chimera in the quinolinic acid rat model of Huntington's syndrome. *Eur J Neurosci* 14: 1753-1761.

Benton RL, Maddie MA, Minnillo DR, Hagg T, Whittemore SR. 2008. Griffonia simplicifolia isolectin B4 identifies a specific subpopulation of angiogenic blood vessels following contusive spinal cord injury in the adult mouse. *J Comp Neurol* 507: 1031-1052.

Benveniste EN. 1997. Cytokines: Influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol* 69: 31-75.

Bergersen LH, Gundersen V. 2009. Morphological evidence for vesicular glutamate release from astrocytes. *Neuroscience* 158: 260-265.

Bergles DE, Jahr CE. 1998. Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 18: 7709-7716.

Bernardino L, Xapelli S, Silva AP, Jakobsen B, Poulsen FR, Oliveira CR, Vezzani A, Malva JO, Zimmer J. 2005. Modulator effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci* 25: 6734-6744.

Bhagat YA, Obenaus A, Hamilton MG, Mikler J, Kendall EJ. 2005. Neuroprotection from soman-induced seizures in the rodent: evaluation with diffusion- and T2-weighted magnetic resonance imaging. *Neurotoxicology* 26: 1001-1013.

- Blanchet G. 1992. Anticonvulsant effects of N-[1-(2-thienyl) cyclohexyl]-piperidine (TCP) in soman poisoning. Pages 831-840 in Kamenka JM, Domino EF, eds. Multiple Sigma and PCP Receptor Ligands: Mechanisms for Neuromodulation and Neuroprotection ? Ann Arbor (MI):: NPP Books.
- Bleck TP. 2007. Intensive care unit management of patients with status epilepticus. *Epilepsia* 48 Suppl 8: 59-60.
- Boggs JG, Painter JA, DeLorenzo RJ. 1993. Analysis of electrocardiographic changes in status epilepticus. *Epilepsy Res* 14: 87-94.
- Borges K, McDermott D, Irier H, Smith Y, Dingleline R. 2006. Degeneration and proliferation of astrocytes in the mouse dentate gyrus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp Neurol* 201: 416-427.
- Borris DJ, Bertram EH, Kapur J. 2000. Ketamine controls prolonged status epilepticus. *Epilepsy Res* 42: 117-122.
- Botchkina GI, Meistrell ME, 3rd, Botchkina IL, Tracey KJ. 1997. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med* 3: 765-781.
- Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, 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.
- Braitman DJ, Sparenborg S. 1989. MK-801 protects against seizures induced by the cholinesterase inhibitor soman. *Brain Res Bull* 23: 145-148.
- Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, Green EJ, Bethea JR. 2005. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med* 202: 145-156.
- Britt JO, Jr., Martin JL, Okerberg CV, Dick EJ, Jr. 2000. Histopathologic changes in the brain, heart, and skeletal muscle of rhesus macaques, ten days after exposure to soman (an organophosphorus nerve agent). *Comp Med* 50: 133-139.
- Bueno A, De Olmos S, Heimer L, De Olmos J. 2003. NMDA-antagonist MK-801-induced neuronal degeneration in Wistar rat brain detected by the Amino-Cupric-Silver method. *Exp Toxicol Pathol* 54: 319-334.
- Buller KM. 2001. Role of circumventricular organs in pro-inflammatory cytokine-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 581-589.

- Burnashev N, Villarroel A, Sakmann B. 1996. Dimensions and ion selectivity of recombinant AMPA and kainate receptor channels and their dependence on Q/R site residues. *J Physiol* 496 (Pt 1): 165-173.
- Campbell IL. 2005. Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis, and disease-associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 166-177.
- Candelario-Jalil E, Alvarez D, Castaneda JM, Al-Dalain SM, Martinez-Sanchez G, Merino N, Leon OS. 2002. The highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor DFU is neuroprotective when given several hours after transient cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res* 927: 212-215.
- Capper EA, Marshall LA. 2001. Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Prog Lipid Res* 40: 167-197.
- Carnevali LS, Pereira CM, Jaqueta CB, Alves VS, Paiva VN, Vattem KM, Wek RC, Mello LE, Castilho BA. 2006. Phosphorylation of the alpha subunit of translation initiation factor-2 by PKR mediates protein synthesis inhibition in the mouse brain during status epilepticus. *Biochem. J.* 397: 187-194.
- Carpentier P, Lambrinidis M, Blanchet G. 1991. Early dendritic changes in hippocampal pyramidal neurones (field CA1) of rats subjected to acute soman intoxication: a light microscopic study. *Brain Res* 541: 293-299.
- Carpentier P, Delamanche IS, Le Bert M, Blanchet G, 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 A, Rondouin G, LernerNatoli M, deGroot DMG, 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, Foquin A, Kamenka JM, Rondouin G, Lerner-Natoli M, de Groot DM, Lallement G. 2001. 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-Tarricone A, Bodjarian N, Rondouin G, Lerner-Natoli M, Kamenka JM, Blanchet G, Denoyer M, Lallement G. 1994. Anticonvulsant and antilethal effects of the phencyclidine derivative TCP in soman poisoning. *Neurotoxicology* 15: 837-851.
- Carpentier P, Testylier G, Baille V, Dhote F, Job A, Pouyatos B, Pernot F, Foquin A, Delacour C, Hamilton M, Dorandeu F. 2008. Soman-Induced Seizures and Related Brain Damage: How to Treat Seizures and Assess Their Effects Non-Invasively? *J Med CBR Def* 6.
- Carroll RC, Zukin RS. 2002. NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci* 25: 571-577.

Carvalho AL, Duarte CB, Carvalho AP. 2000. Regulation of AMPA receptors by phosphorylation. *Neurochem Res* 25: 1245-1255.

Casamenti F, Prosperi C, Scali C, Giovannelli L, Colivicchi MA, Fausone-Pellegrini MS, Pepeu G. 1999. Interleukin-1beta activates forebrain glial cells and increases nitric oxide production and cortical glutamate and GABA release in vivo: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 91: 831-842.

Castro-Alamancos MA, Connors BW. 1997. Thalamocortical synapses. *Prog Neurobiol* 51: 581-606.

Cavus I, Kasoff WS, Cassaday MP, Jacob R, Gueorguieva R, Sherwin RS, Krystal JH, Spencer DD, Abi-Saab WM. 2005. Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Ann Neurol* 57: 226-235.

Chakfe Y, Seguin R, Antel JP, Morissette C, Malo D, Henderson D, Seguela P. 2002. ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels. *J Neurosci* 22: 3061-3069.

Chao CC, Hu S, Peterson PK. 1995. Glia, cytokines, and neurotoxicity. *Crit Rev Neurobiol* 9: 189-205.

Chapman AG, Meldrum B. 2006. Glutamate and glutamate receptors. Pages 295-303 in Treiman CGWaDM, ed. *Status epilepticus*. Cambridge, Massachusetts: The MIT Press.

Chapman MG, Smith M, Hirsch NP. 2001. Status epilepticus. *Anaesthesia* 56: 648-659.

Chapman S, Kadar T, Gilat E. 2006. Seizure duration following sarin exposure affects neuro-inflammatory markers in the rat brain. *Neurotoxicology* 27: 277-283.

Chaudhry UA, Zhuang H, Crain BJ, Dore S. 2008. Elevated microsomal prostaglandin-E synthase-1 in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 4: 6-13.

Chen AC, Shin KH, Duman RS, Sanacora G. 2001. ECS-Induced mossy fiber sprouting and BDNF expression are attenuated by ketamine pretreatment. *J ECT* 17: 27-32.

Chen C, Bazan NG. 2005. Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 93: 929-941.

Chen J, Wasterlain CG. 2006. Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *Lancet Neurol* 5: 246-256.

Chen J, Marsh T, Zhang JS, Graham SH. 1995. Expression of cyclo-oxygenase 2 in rat brain following kainate treatment. *Neuroreport* 6: 245-248.

Chen PE, Wyllie DJ. 2006. Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. *Br J Pharmacol* 147: 839-853.

Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NE, Vogel SN. 2003. Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 748-755.

Cheng B, Christakos S, Mattson M. 1994. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12: 139-153.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

Chopp M, Li Y, Jiang N, Zhang RL, Probst J. 1996. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 578-584.

Churchill L, Pazdernik TL, Jackson JL, Nelson SR, Samson FE, McDonough JH, Jr., McLeod CG, Jr. 1985. Soman-induced brain lesions demonstrated by muscarinic receptor autoradiography. *Neurotoxicology* 6: 81-90.

Ciceri P, Zhang Y, Shaffer AF, Leahy KM, Woerner MB, Smith WG, Seibert K, Isakson PC. 2002. Pharmacology of celecoxib in rat brain after kainate administration. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 846-852.

Clair B, Demeret S, Dupont S, Tazarourte K. 2009. [Management of convulsive status epilepticus: therapeutic strategies]. *Rev Neurol (Paris)* 165: 366-372.

Clark SR, McMahon CJ, Gueorguieva I, Rowland M, Scarth S, Georgiou R, Tyrrell PJ, Hopkins SJ, Rothwell NJ. 2008. Interleukin-1 receptor antagonist penetrates human brain at experimentally therapeutic concentrations. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 387-394.

Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Roberts EF, Johnstone EM, Sharp JD, Little SP, Kramer RM. 1996. Reactive glia express cytosolic phospholipase A2 after transient global forebrain ischemia in the rat. *Stroke* 27: 527-535.

Cock HR, Tong X, Hargreaves IP, Heales SJ, Clark JB, Patsalos PN, Thom M, Groves M, Schapira AH, Shorvon SD, Walker MC. 2002. Mitochondrial dysfunction associated with neuronal death following status epilepticus in rat. *Epilepsy Res* 48: 157-168.

Coeytaux A, Jallon P, Galobardes B, Morabia A. 2000. Incidence of status epilepticus in French-speaking Switzerland: (EPISTAR). *Neurology* 55: 693-697.

Cole-Edwards KK, Bazan NG. 2005. Lipid signaling in experimental epilepsy. *Neurochem Res* 30: 847-853.

Collaco-Moraes Y, Aspey B, Harrison M, de Belleruche J. 1996. Cyclo-oxygenase-2 messenger RNA induction in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 1366-1372.

Collignon F. 2008. Chirurgie fonctionnelle des epilepsies réfractaires: nouvelles approches physiopathologiques, diagnostiques et thérapeutiques. Pages 116. Doctorat en sciences biomédicales et pharmaceutiques.

Collombet JM, Four E, Bernabe D, Masqueliez C, Burckhart MF, Baille V, Baubichon D, Lallement G. 2005. Soman poisoning increases neural progenitor proliferation and induces long-term glial activation in mouse brain. *Toxicology* 208: 319-334.

Collombet JM, Carpentier P, Baille V, Four E, Bernabe D, Burckhart MF, Masqueliez C, Baubichon D, Lallement G. 2006. Neuronal regeneration partially compensates the delayed neuronal cell death observed in the hippocampal CA1 field of soman-poisoned mice. *Neurotoxicology* 27: 201-209.

Collombet JM, Pierard C, Beracochea D, Coubard S, Burckhart MF, Four E, Masqueliez C, Baubichon D, Lallement G. 2008. Long-term consequences of soman poisoning in mice Part 1. Neuropathology and neuronal regeneration in the amygdala. *Behav Brain Res* 191: 88-94.

Combadiere B, Combadiere C, Deterre P. 2007. Chemokines: a sophisticated cell-guidance network. *Med Sci (Paris)* 23: 173-179.

Corsellis JA, Bruton CJ. 1983. Neuropathology of status epilepticus in humans. *Adv Neurol* 34: 129-139.

Coussen F, Perrais D, Jaskolski F, Sachidhanandam S, Normand E, Bockaert J, Marin P, Mulle C. 2005. Co-assembly of two GluR6 kainate receptor splice variants within a functional protein complex. *Neuron* 47: 555-566.

Coutinho V, Knopfel T. 2002. Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist* 8: 551-561.

Craven R. 2007. Ketamine. *Anaesthesia* 62 Suppl 1: 48-53.

Crespel A, Rigau V, Coubes P, Rousset MC, de Bock F, Okano H, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Lerner-Natoli M. 2005. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 19: 436-450.

Croker BA, et al. 2003. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat. Immunol.* 4: 540-545.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11: 327-335.

Cunningham ET, De Souza EB. 1993. Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunol Today* 14: 171-176.

Danbolt NC, Chaudhry FA, Dehnes Y, Lehre KP, Levy LM, Ullensvang K, Storm-Mathisen J. 1998. Properties and localization of glutamate transporters. *Prog Brain Res* 116: 23-43.

Dantzer R. 2009. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol Allergy Clin North Am* 29: 247-264.

Dantzer R, Konsman JP, Bluthé RM, Kelley KW. 2000. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci* 85: 60-65.

David Y, Cacheaux LP, Ivens S, Lapilover E, Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. 2009. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis? *J Neurosci* 29: 10588-10599.

Davies NM, Good RL, Roupe KA, Yanez JA. 2004. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error ? - Not as easy as 1, 2, 3. *J Pharm Pharm Sci* 7: 217-226.

de Groot DM, Bierman EP, Bruijnzeel PL, Carpentier P, Kulig BM, Lallement G, Melchers BP, Philippens IH, van Huygevoort AH. 2001. Beneficial effects of TCP on soman intoxication in guinea pigs: seizures, brain damage and learning behaviour. *J Appl Toxicol* 21 Suppl 1: S57-65.

de Lanerolle NC, Lee TS, Spencer DD. 2010. Astrocytes and epilepsy. *Neurotherapeutics* 7: 424-438.

De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Marchesi F, De Luigi A, Garattini S, Vezzani A. 2000. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur. J. Neurosci.* 12: 2623-2633.

Declercq W, Denecker G, Fiers W, Vandenaabeele P. 1998. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol* 161: 390-399.

DeClue AE, Cohn LA, Lechner ES, Bryan ME, Dodam JR. 2008. Effects of subanesthetic doses of ketamine on hemodynamic and immunologic variables in dogs with experimentally induced endotoxemia. *Am J Vet Res* 69: 228-232.

Degos V, Chhor V, Gressens P, Mantz J. 2009. Neuro-inflammation aiguë et stratégies neuroprotectrices. *Réanimation* 18: 556-565.

Degos V, Teissier N, Gressens P, Puybasset L, Mantz J. 2008. Inflammation and acute brain injuries in intensive care. *Ann Fr Anesth Reanim* 27: 1008-1015.

- Deleforge J, Davot JL, Boisrame B, Delatour P. 1991. Enantioselectivity in the anaesthetic effect of ketamine in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 14: 418-420.
- DeLorenzo RJ, Garnett LK, Towne AR, Waterhouse EJ, Boggs JG, Morton L, Choudhry MA, Barnes T, Ko D. 1999. Comparison of status epilepticus with prolonged seizure episodes lasting from 10 to 29 minutes. *Epilepsia* 40: 164-169.
- Deng X, Bertini G, Xu Y-Z, Yan Z, Bentivoglio M. 2006. Cytokine-induced activation of glial cells in the mouse brain is enhanced at an advanced age. *Neuroscience* 141: 645-661.
- Denoyer M, Lallement G, Collet A, Pernot-Marino I, Sereno D, Blanchet G. 1992. Influence of medial septal cholinceptive cells on c-Fos-like proteins induced by soman. *Brain Res* 592: 157-162.
- Depaulis A. 2003. Physiopathologie des crises d'épilepsie. Paris: Editions Scientifiques et Médicales elsevier SAS. Report no. 17-044-R-10, p. 10.
- Dillman JF, 3rd, Phillips CS, Kniffin DM, Tompkins CP, Hamilton TA, Kan RK. 2009. Gene expression profiling of rat hippocampus following exposure to the acetylcholinesterase inhibitor soman. *Chem Res Toxicol* 22: 633-638.
- Dinarelo CA. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77: 1627-1652.
- Docagne F, Campbell SJ, Bristow AF, Poole S, Vignes S, Guaza C, Perry VH, Anthony DC. 2005. Differential regulation of type I and type II interleukin-1 receptors in focal brain inflammation. *Eur J Neurosci* 21: 1205-1214.
- Dong Y, Benveniste EN. 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36: 180-190.
- Dopp JM, Mackenzie-Graham A, Otero GC, Merrill JE. 1997. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol* 75: 104-112.
- Dorandeu F, Lallement G, Carpentier P, Filliat P, Collombet JM, Ruttimann M. 2003. Neuroprotecton et neurotoxiques organophosphorés : quelle place pour la kétamine ? Pages 77-96 in Arnette, ed. Ketamine. Rueil-Malmaison, France.
- Dorandeu F, Carpentier P, Baubichon D, Four E, Bernabe D, Burckhart MF, Lallement G. 2005. Efficacy of the ketamine-atropine combination in the delayed treatment of soman-induced status epilepticus. *Brain Res.* 1051: 164-175.
- Dorandeu F, Baille V, Mikler J, Testylier G, Lallement G, Sawyer T, Carpentier P. 2007. Protective effects of S(+) ketamine and atropine against lethality and brain damage during soman-induced status epilepticus in guinea-pigs. *Toxicology* 234: 185-193.

- Dorandeu F, Carpentier P, Baille-Le Crom V, Dhote F, Testylier G, Pernot F, Mion G, Ruttimann M, Lallement G. 2010. Field treatment of soman-induced self-sustaining status epilepticus. Are ketamine and other NMDA antagonists the only options ? Pages 149-183 in Weissman B, Raveh L, eds. *The Neurochemical Consequences of Organophosphate Poisoning in the CNS*. Kerala, India: Transworld Research Network
- Dube C, Vezzani A, Behrens M, Bartfai T, Baram TZ. 2005. Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann Neurol* 57: 152-155.
- Dudek FE, Sutula TP. 2007. Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. *Prog Brain Res* 163: 755-773.
- Dupont S, Crespel A. 2009. Satus epilepticus: epidemiology, definitions and classifications. *Rev Neurol (Paris)* 165: 307-314.
- Dusart I, Marty S, Peschanski M. 1992. Demyelination, and remyelination by Schwann cells and oligodendrocytes after kainate-induced neuronal depletion in the central nervous system. *Neuroscience* 51: 137-148.
- Eid T, Williamson A, Lee TS, Petroff OA, de Lanerolle NC. 2008. Glutamate and astrocytes--key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia* 49 Suppl 2: 42-52.
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. 2009. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158: 1021-1029.
- el-Etri MM, Nickell WT, Ennis M, Skau KA, Shipley MT. 1992. Brain norepinephrine reductions in soman-intoxicated rats: association with convulsions and AChE inhibition, time course, and relation to other monoamines. *Exp Neurol* 118: 153-163.
- Engrand N, Crespel A. 2009. Pathophysiologic basis of status epilepticus. *Rev Neurol (Paris)* 165: 315-319.
- Engrand N, Demeret S, Savary D, Clair B. 2009. Non specific treatment of status epilepticus. *Rev Neurol (Paris)* 165: 348-354.
- Eriksson C, Winblad B, Schultzberg M. 1998. Kainic acid induced expression of interleukin-1 receptor antagonist mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 58: 195-208.
- Eriksson C, Tehranian R, Iverfeldt K, Winblad B, Schultzberg M. 2000. Increased expression of mRNA encoding interleukin-1beta and caspase-1, and the secreted isoform of interleukin-1 receptor antagonist in the rat brain following systemic kainic acid administration. *J Neurosci Res* 60: 266-279.
- Eriksson C, Van Dam AM, Lucassen PJ, Bol J, Winblad B, Schultzberg M. 1999. Immunohistochemical localization of interleukin-1 beta , interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta converting enzyme/caspase-1 in the rat brain after peripheral administration of kainic acid. *Neuroscience*. 93: 915-930.

- Fabene PF, et al. 2008. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nat Med* 14: 1377-1383.
- Farber K, Kettenmann H. 2005. Physiology of microglial cells. *Brain Res. Rev.* 48: 133-143.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28: 138-145.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. 2000. Deacylation and reacylation of neural membrane glycerophospholipids. *J Mol Neurosci* 14: 123-135.
- Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. 2006. Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol Rev* 58: 591-620.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24: 2143-2155.
- Favrais G, Schwendimann L, Gressens P, Lelievre V. 2007. Cyclooxygenase-2 mediates the sensitizing effects of systemic IL-1-beta on excitotoxic brain lesions in newborn mice. *Neurobiol Dis* 25: 496-505.
- Feinstein DL, Heneka MT, Gavrilyuk V, DelloRusso C, Weinberg G, Galea E. 2002. Noradrenergic regulation of inflammatory gene expression in brain. *Neurochem. Int.* 41: 357-365.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G. 2004. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43: 729-743.
- Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. 1995. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 95: 1669-1675.
- Fiebich BL, Hull M, Lieb K, Gyufko K, Berger M, Bauer J. 1997. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. *J Neurochem* 68: 704-709.
- Figiel I. 2008. Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68: 526-534.
- Figiel I, Dzwonek K. 2007. TNFalpha and TNF receptor 1 expression in the mixed neuronal-glial cultures of hippocampal dentate gyrus exposed to glutamate or trimethyltin. *Brain Res.* 1131: 17-28.

- Filipovic R, Zecevic N. 2008. Neuroprotective role of minocycline in co-cultures of human fetal neurons and microglia. *Exp Neurol* 211: 41-51.
- Filliat P, Coubard S, Pierard C, Liscia P, Beracochea D, Four E, Baubichon D, Masqueliez C, Lallement G, Collombet JM. 2007. Long-term behavioral consequences of soman poisoning in mice. *Neurotoxicology* 28: 508-519.
- Finney SJ, Hirsch NP. 2005. Status epilepticus. *Curr Anaesth & Crit Care* 16: 123-131.
- Flecknell PA. 1987. *Laboratory Animal Anesthesia. An Introduction for Research Workers and Technicians*. London: Academic Press.
- Fleming JJ, England PM. 2010. AMPA receptors and synaptic plasticity: a chemist's perspective. *Nat Chem Biol* 6: 89-97.
- Fonnum F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42: 1-11.
- Foresti ML, Arisi GM, Katki K, Montanez A, Sanchez RM, Shapiro LA. 2009. Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 are increased in the hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *J Neuroinflammation* 6: 40.
- Fosbraey P, Wetherell JR, French MC. 1990. Neurotransmitter changes in guinea-pig brain regions following soman intoxication. *J Neurochem* 54: 72-79.
- Fountain NB, Lothman EW. 1995. Pathophysiology of status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* 12: 326-342.
- Foussat A, Galanaud P, Emilie D. 2000. Les chimiokines et la longue marche des leucocytes. *Med Sci* 16: 757-766.
- Franklin KBJ, Paxinos G. 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- French RA, VanHoy RW, Chizzonite R, Zachary JF, Dantzer R, Parnet P, Bluthé RM, Kelley KW. 1999. Expression and localization of p80 and p68 interleukin-1 receptor proteins in the brain of adult mice. *J Neuroimmunol* 93: 194-202.
- Frijns CJM, Kappelle LJ. 2002. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *J. Cereb. Circ.* 33: 2115-2122.
- Fujikawa DG. 2005. Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection. *Epilepsy Behav* 7 Suppl 3: S3-11.
- Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. 2000. Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia* 41 Suppl 6: S9-13.

- Fujimoto M, Naka T. 2003. Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends Immunol.* 24: 659-666.
- Garau A, Bertini R, Colotta F, Casilli F, Bigini P, Cagnotto A, Mennini T, Ghezzi P, Villa P. 2005. Neuroprotection with the CXCL8 inhibitor repertaxin in transient brain ischemia. *Cytokine* 30: 125-131.
- Garcia JH, Liu KF, Relton JK. 1995. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. *Am J Pathol* 147: 1477-1486.
- Gastaut H. 1983. Classification of status epilepticus. *Adv Neurol* 34: 15-35.
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H. 1995. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15: 193-204.
- Gélisse P, Crespel A, Genton P. 2007. Epilepsies généralisées. Pages 16. *Encycl Med Chir, Neurologie*. Paris: Editions Scientifiques et Médicales elsevier SAS.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260.
- Gobbo OL, O'Mara SM. 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.
- Golding EM. 2002. Sequelae following traumatic brain injury. The cerebrovascular perspective. *Brain Res Brain Res Rev* 38: 377-388.
- Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. 1999. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 32: 619-631.
- Gomes JA, Stevens RD, Lewin JJ, 3rd, Mirski MA, Bhardwaj A. 2005. Glucocorticoid therapy in neurologic critical care. *Crit Care Med* 33: 1214-1224.
- Gomez-Gonzalo M, Losi G, Chiavegato A, Zonta M, Cammarota M, Brondi M, Vetri F, Uva L, Pozzan T, de Curtis M, Ratto GM, Carmignoto G. 2010. An excitatory loop with astrocytes contributes to drive neurons to seizure threshold. *PLoS Biol* 8: e1000352.
- Gong C, Qin Z, Betz AL, Liu XH, Yang GY. 1998. Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 801: 1-8.

- Gonzales JM, Loeb AL, Reichard PS, Irvine S. 1995. Ketamine inhibits glutamate-, N-methyl-D-aspartate-, and quisqualate-stimulated cGMP production in cultured cerebral neurons. *Anesthesiology* 82: 205-213.
- Goodkin HP, Yeh JL, Kapur J. 2005. Status epilepticus increases the intracellular accumulation of GABAA receptors. *J Neurosci* 25: 5511-5520.
- Goodkin HP, Joshi S, Mtchedlishvili Z, Brar J, Kapur J. 2008. Subunit-specific trafficking of GABA(A) receptors during status epilepticus. *J Neurosci* 28: 2527-2538.
- Gordon CJ, Rowsey PJ. 1998. Poisons and fever. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25: 145-149.
- Gouder N, Fritschy JM, Boison D. 2003. Seizure suppression by adenosine A1 receptor activation in a mouse model of pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsia* 44: 877-885.
- Goux E, Leveille F, Nicole O, Melon C, Had-Aissouni L, Buisson A. 2009. Reverse glial glutamate uptake triggers neuronal cell death through extrasynaptic NMDA receptor activation. *Mol Cell Neurosci* 40: 463-473.
- Grauer E, Chapman S, Rabinovitz I, Raveh L, Weissman BA, Kadar T, Allon N. 2008. Single whole-body exposure to sarin vapor in rats: long-term neuronal and behavioral deficits. *Toxicol Appl Pharmacol* 227: 265-274.
- Groc L, Bard L, Choquet D. 2009. Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 158: 4-18.
- Guillemin GJ, Brew BJ. 2004. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 75: 388-397.
- Hagan P, Poole, S., Bristow, A.F., Tilders, F., Silverstein, F.S. 1996. Intracerebral NMDA injection stimulates production of interleukin-1 beta in perinatal brain. *J. Neurochem.* 67: 2215-2218.
- Hailer NP. 2008. Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Prog Neurobiol* 84: 211-233.
- Hall ED. 1985. High-dose glucocorticoid treatment improves neurological recovery in head-injured mice. *J Neurosurg* 62: 882-887.
- Hamaguchi K, Kuwata H, Yoshihara K, Masuda S, Shimbara S, Oh-ishi S, Murakami M, Kudo I. 2003. Induction of distinct sets of secretory phospholipase A(2) in rodents during inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1635: 37-47.
- Hanasaki K. 2004. Mammalian phospholipase A2: phospholipase A2 receptor. *Biol Pharm Bull* 27: 1165-1167.

- Hayakawa M, Ishida N, Takeuchi K, Shibamoto S, Hori T, Oku N, Ito F, Tsujimoto M. 1993. Arachidonic acid-selective cytosolic phospholipase A2 is crucial in the cytotoxic action of tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 268: 11290-11295.
- Hayward IJ, Wall HG, Jaax NK, Wade JV, Marlow DD, Nold JB. 1990. Decreased brain pathology in organophosphate-exposed rhesus monkeys following benzodiazepine therapy. *J Neurol Sci* 98: 99-106.
- Heinrich C, Nitta N, Flubacher A, Muller M, Fahrner A, Kirsch M, Freiman T, Suzuki F, Depaulis A, Frotscher M, Haas CA. 2006. Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *J Neurosci* 26: 4701-4713.
- Henthorn TK, Krejcie TC, Niemann CU, Enders-Klein C, Shanks CA, Avram MJ. 1999. Ketamine distribution described by a recirculatory pharmacokinetic model is not stereoselective. *Anesthesiology* 91: 1733-1743.
- Hertz L. 2006. Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzba III. *Neurochem Int* 48: 416-425.
- Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 57: 417-428.
- Herx LM, Yong VW. 2001. Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 961-971.
- Hetman M, Giorgi K, Kharebava G. 2006. Survival signaling pathways activated by NMDA receptors. *Curr Top Med Chem*. 6: 787-799.
- Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW. 1994. Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* 13: 487-494.
- Hewett SJ, Uliasz TF, Vidwans AS, Hewett JA. 2000. Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 417-425.
- Hilmas CJ, Williams PT. 2007. Novel mechanism to explain ketamine efficacy against nerve agent-induced seizures. Paper presented at Defence against the effects of chemical hazards: Toxicology, Diagnosis and medical countermeasures, Edinburgh, Scotland.
- Himmelseher S, Durieux ME. 2005. Revising a dogma: ketamine for patients with neurological injury? *Anesth Analg* 101: 524-534.
- Hirayama M, Kuriyama M. 2001. MK-801 is cytotoxic to microglia in vitro and its cytotoxicity is attenuated by glutamate, other excitotoxic agents and atropine. Possible presence of glutamate receptor and muscarinic receptor on microglia. *Brain Res*. 897: 204-206.

- Hirota K, Lambert DG. 1996a. I.v. anaesthetic agents do not interact with the verapamil binding site on L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Br J Anaesth* 77: 385-386.
- Hirota K, Lambert DG. 1996b. Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. *Br J Anaesth* 77: 441-444.
- Hirst WD, Young KA, Newton R, Allport VC, Marriott DR, Wilkin GP. 1999. Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 13: 57-68.
- Hoffmann C. 2000. COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use. *Curr Med Chem* 7: 1113-1120.
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. 1991. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252: 851-853.
- Hopkins SJ, Rothwell NJ. 1995. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci* 18: 83-88.
- Hosli E, Hosli L. 1988. Autoradiographic localization of binding sites for muscarinic and nicotinic agonists and antagonists on cultured astrocytes. *Exp Brain Res* 71: 450-454.
- Hu S, Chao CC, Ehrlich LC, Sheng WS, Sutton RL, Rockswold GL, Peterson PK. 1999. Inhibition of microglial cell RANTES production by IL-10 and TGF-beta. *J Leukoc Biol* 65: 815-821.
- Hu Y, Lund IV, Gravielle MC, Farb DH, Brooks-Kayal AR, Russek SJ. 2008. Surface expression of GABAA receptors is transcriptionally controlled by the interplay of cAMP-response element-binding protein and its binding partner inducible cAMP early repressor. *J Biol Chem* 283: 9328-9340.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6: 279-284.
- Hulse RE, Kunkler PE, Fedynyshyn JP, Kraig RP. 2004. Optimization of multiplexed bead-based cytokine immunoassays for rat serum and brain tissue. *J Neurosci Methods* 136: 87-98.
- Hutchinson PJ, O'Connell MT, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Nortje J, Carpenter KL, Timofeev I, Al-Rawi PG, Menon DK, Pickard JD. 2007. Inflammation in human brain injury: intracerebral concentrations of IL-1alpha, IL-1beta, and their endogenous inhibitor IL-1ra. *J Neurotrauma* 24: 1545-1557.
- Ichai C, P. GJ, Grimaud D. 1996. Etat de mal épileptique chez l'adulte. Paper presented at Conférences d'actualisation, Paris.

- Ikeda-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. 2006. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11790-11795.
- Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. 2004. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 11: 15-21.
- Inoue W, Matsumura K, Yamagata K, Takemiya T, Shiraki T, Kobayashi S. 2002. Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever. *Neurosci Res* 44: 51-61.
- Itoh T, Satou T, Nishida S, Hashimoto S, Ito H. 2007. Immature and mature neurons coexist among glial scars after rat traumatic brain injury. *Neurol Res* 29: 734-742.
- Ivens S, Kaufer D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, Seiffert E, Heinemann U, Friedman A. 2007. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* 130: 535-547.
- Jabs R, Seifert G, Steinhauser C. 2008. Astrocytic function and its alteration in the epileptic brain. *Epilepsia* 49 Suppl 2: 3-12.
- Jane DE, Lodge D, Collingridge GL. 2009. Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology* 56: 90-113.
- Jankowsky JL, Patterson PH. 2001. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol* 63: 125-149.
- Jankowsky JL, Derrick BE, Patterson PH. 2000. Cytokine responses to LTP induction in the rat hippocampus: a comparison of in vitro and in vivo techniques. *Learn Mem* 7: 400-412.
- Jaskolski F. 2004. Distribution subcellulaire des récepteurs du glutamate de type kainate. Neuroscience Doctorate.
- Jevtovic-Todorovic V, Carter LB. 2005. The anesthetics nitrous oxide and ketamine are more neurotoxic to old than to young rat brain. *Neurobiol Aging* 26: 947-956.
- Jiang J, Borisenko GG, Osipov A, Martin I, Chen R, Shvedova AA, Sorokin A, Tyurina YY, Potapovich A, Tyurin VA, Graham SH, Kagan VE. 2004. Arachidonic acid-induced carbon-centered radicals and phospholipid peroxidation in cyclo-oxygenase-2-transfected PC12 cells. *J Neurochem* 90: 1036-1049.
- Jiang N, Moyle M, Soule HR, Rote WE, Chopp M. 1995. Neutrophil inhibitory factor is neuroprotective after focal ischemia in rats. *Ann Neurol* 38: 935-942.

Johnson EA, Kan RK. 2010. The acute phase response and soman-induced status epilepticus: temporal, regional and cellular changes in rat brain cytokine concentrations. *J Neuroinflammation* 7: 40.

Jonas P. 1993. AMPA-type glutamate receptors--nonselective cation channels mediating fast excitatory transmission in the CNS. *Exs.* 66: 61-76.

Jones-Davis DM, Macdonald RL. 2003. GABA(A) receptor function and pharmacology in epilepsy and status epilepticus. *Curr Opin Pharmacol* 3: 12-18.

Jorgensen MB, Finsen BR, Jensen MB, Castellano B, Diemer NH, Zimmer J. 1993. Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp Neurol* 120: 70-88.

Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A. 2007. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10: 331-339.

Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim J, Sinn DI, Kim JM, Park DK, Lee JJ, Kim SU, Kim M, Lee SK, Roh JK. 2006. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis* 23: 237-246.

Kam PCA, So A. 2009. COX-3: Uncertainties and controversies. *Current Anaesthesia & Critical Care* 20: 50-53.

Kambara T, Inada T, Kubo K, Shingu K. 2009. Propofol suppresses prostaglandin E(2) production in human peripheral monocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 31: 117-126.

Kamikawa H, Hori T, Nakane H, Aou S, Tashiro N. 1998. IL-1beta increases norepinephrine level in rat frontal cortex: involvement of prostanoids, NO, and glutamate. *Am J Physiol* 275: R803-810.

Kang TC, Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Won MH, Kim DW, Choi SY, Kwon OS. 2006. Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. *Glia* 54: 258-271.

Kapur J, Macdonald RL. 1997. Rapid seizure-induced reduction of benzodiazepine and Zn²⁺ sensitivity of hippocampal dentate granule cell GABA_A receptors. *J Neurosci* 17: 7532-7540.

Katayama T, Tanaka H, Yoshida T, Uehara T, Minami M. 2009. Neuronal injury induces cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) production in astrocytes. *J Pharmacol Sci* 109: 88-93.

Kawaguchi K, Hickey RW, Rose ME, Zhu L, Chen J, Graham SH. 2005. Cyclooxygenase-2 expression is induced in rat brain after kainate-induced seizures and promotes neuronal death in CA3 hippocampus. *Brain Res* 1050: 130-137.

Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Ogata J, Inoue Y, Shigematsu A. 1999. Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro. *Anesth. Analg.* 89: 665-669.

Kernie SG, Parent JM. 2010. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 37: 267-274.

Khurgel M, Switzer RC, 3rd, Teskey GC, Spiller AE, Racine RJ, Ivy GO. 1995. Activation of astrocytes during epileptogenesis in the absence of neuronal degeneration. *Neurobiol Dis* 2: 23-35.

Kim HJ, Chung JI, Lee SH, Jung YS, Moon CH, Baik EJ. 2008. Involvement of endogenous prostaglandin F₂alpha on kainic acid-induced seizure activity through FP receptor: the mechanism of proconvulsant effects of COX-2 inhibitors. *Brain Res* 1193: 153-161.

Kim JE, Ryu HJ, Yeo SI, Kang TC. 2010. P2X7 receptor regulates leukocyte infiltrations in rat frontoparietal cortex following status epilepticus. *J Neuroinflammation* 7: 65.

Kinouchi K, Brown G, Pasternak G, Donner DB. 1991. Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 1532-1538.

Kinsey GR, Cummings BS, Beckett CS, Saavedra G, Zhang W, McHowat J, Schnellmann RG. 2005. Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA2. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 287-293.

Kishimoto K, Matsumura K, Kataoka Y, Morii H, Watanabe Y. 1999. Localization of cytosolic phospholipase A2 messenger RNA mainly in neurons in the rat brain. *Neuroscience* 92: 1061-1077.

Kleen JK, Holmes GL. 2008. Brain inflammation initiates seizures. *Nat Med* 14: 1309-1310.

Klein MA, Moller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G. 1997. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia* 19: 227-233.

Klimscha W, Horvath G, Szikszay M, Dobos I, Benedek G. 1998. Antinociceptive effect of the S(+)-enantiomer of ketamine on carrageenan hyperalgesia after intrathecal administration in rats. *Anesth Analg* 86: 561-565.

Knoblach SM, Fan L, Faden AI. 1999. Early neuronal expression of tumor necrosis factor-alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J Neuroimmunol* 95: 115-125.

Knobloch M, Portier CJ, Levionnois OL, Theurillat R, Thormann W, Spadavecchia C, Mevissen M. 2006. Antinociceptive effects, metabolism and disposition of ketamine in ponies under target-controlled drug infusion. *Toxicol Appl Pharmacol* 216: 373-386.

- Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K. 1990. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5548-5552.
- Kohrs R, Durieux ME. 1998. Ketamine: teaching an old drug new tricks. *Anesth. Analg.* 87: 1186-1193.
- Koistinaho J, Koponen S, Chan PH. 1999. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA after global ischemia is regulated by AMPA receptors and glucocorticoids. *Stroke* 30: 1900-1905; discussion 1905-1906.
- Kokate TG, Cohen AL, Karp E, Rogawski MA. 1996. Neuroactive steroids protect against pilocarpine- and kainic acid-induced limbic seizures and status epilepticus in mice. *Neuropharmacology* 35: 1049-1056.
- Kolko M, DeCoster MA, de Turco EB, Bazan NG. 1996. Synergy by secretory phospholipase A2 and glutamate on inducing cell death and sustained arachidonic acid metabolic changes in primary cortical neuronal cultures. *J Biol Chem* 271: 32722-32728.
- Kolko M, de Turco EB, Diemer NH, Bazan NG. 2002. Secretory phospholipase A2-mediated neuronal cell death involves glutamate ionotropic receptors. *Neuroreport* 13: 1963-1966.
- Kolko M, Christoffersen NR, Barreiro SG, Miller ML, Pizza AJ, Bazan NG. 2006. Characterization and location of secretory phospholipase A2 groups IIE, V, and X in the rat brain. *J Neurosci Res* 83: 874-882.
- Kulmacz RJ, Lands WE. 1983. Requirements for hydroperoxide by the cyclooxygenase and peroxidase activities of prostaglandin H synthase. *Prostaglandins* 25: 531-540.
- Kunz T, Oliw EH. 2001. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib reduces kainate-induced cell death in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 13: 569-575.
- Kvamme E, Roberg B, Torgner IA. 2000. Phosphate-activated glutaminase and mitochondrial glutamine transport in the brain. *Neurochem Res* 25: 1407-1419.
- Laflamme N, Lacroix S, Rivest S. 1999. An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. *J Neurosci* 19: 10923-10930.
- Lai AY, Swayze RD, El-Husseini A, Song C. 2006. Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *J Neuroimmunol* 175: 97-106.
- Lallement G, Carpentier P, Pernot-Marino I, Baubichon D, Collet A, Blanchet G. 1991a. Involvement of the different rat hippocampal glutamatergic receptors in development of seizures induced by soman: an autoradiographic study. *Neurotoxicology* 12: 655-664.

Lallement G, Carpentier P, Collet A, Pernot-Marino I, Baubichon D, Blanchet G. 1991b. Effects of soman-induced seizures on different extracellular amino acid levels and on glutamate uptake in rat hippocampus. *Brain Research* 563: 234-240.

Lallement G, Carpentier P, Collet A, Baubichon D, Pernot-Marino I, Blanchet G. 1992a. Extracellular acetylcholine changes in rat limbic structures during soman-induced seizures. *Neurotoxicology* 13: 557-567.

Lallement G, Pernot-Marino I, Baubichon D, Burckhart MF, Carpentier P, Blanchet G. 1994. Modulation of soman-induced neuropathology with an anticonvulsant regimen. *Neuroreport* 5: 2265-2268.

Lallement G, Baubichon D, Clarencon D, Galonnier M, Peoch M, Carpentier P. 1999. Review of the value of gacyclidine (GK-11) as adjuvant medication to conventional treatments of organophosphate poisoning: Primate experiments mimicking various scenarios of military or terrorist attack by soman. *Neurotoxicology* 20: 675-684.

Lallement G, Carpentier P, Collet A, Pernot-Marino I, Baubichon D, Sentenac-Roumanou H, Blanchet G. 1991c. Involvement of glutamatergic system of amygdala in generalized seizures induced by soman: comparison with the hippocampus. *C R Acad Sci III* 313: 421-426.

Lallement G, Denoyer M, Collet A, Pernot-Marino I, Baubichon D, Monmaur P, Blanchet G. 1992b. Changes in hippocampal acetylcholine and glutamate extracellular levels during soman-induced seizures: influence of septal cholinergic cells. *Neurosci Lett* 139: 104-107.

Lallement G, Delamanche IS, Pernot-Marino I, Baubichon D, Denoyer M, Carpentier P, Blanchet G. 1993. Neuroprotective activity of glutamate receptor antagonists against soman-induced hippocampal damage: quantification with an omega 3 site ligand. *Brain Res* 618: 227-237.

Lallement G, Clarencon D, Brochier G, Baubichon D, Galonnier M, Blanchet G, Mestries JC. 1997a. Efficacy of atropine/pralidoxime/diazepam or atropine/HI-6/prodiazepam in primates intoxicated by soman. *Pharmacol Biochem Behav* 56: 325-332.

Lallement G, Clarencon D, Masqueliez C, Baubichon D, Galonnier M, Burckhart MF, Peoch H, Mestries JC. 1998. Nerve agent poisoning in primates: antilethal, anti-epileptic and neuroprotective effects of GK-11. *Arch Toxicol* 72: 84-92.

Lallement G, Renault F, Baubichon D, Peoc'h M, Burckhart MF, Galonnier M, Clarencon D, Jourdil N. 2000. Compared efficacy of diazepam or avizafone to prevent soman-induced electroencephalographic disturbances and neuropathology in primates: relationship to plasmatic benzodiazepine pharmacokinetics. *Arch Toxicol* 74: 480-486.

Lallement G, Mestries JC, Privat A, Brochier G, Baubichon D, Carpentier P, Kamenka JM, Sentenac-Roumanou H, Burckhart MF, Peoc'h M. 1997b. GK 11: promising additional neuroprotective therapy for organophosphate poisoning. *Neurotoxicology* 18: 851-856.

- Lambeau G, Barhanin J, Schweitz H, Qar J, Lazdunski M. 1989. Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *J Biol Chem* 264: 11503-11510.
- Lambertsen KL, Clausen BH, Fenger C, Wulf H, Owens T, Dagnaes-Hansen F, Meldgaard M, Finsen B. 2007. Microglia and macrophages express tumor necrosis factor receptor p75 following middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 144: 934-949.
- Lamont SR, Stanwell BJ, Hill R, Reid IC, Stewart CA. 2005. Ketamine pre-treatment dissociates the effects of electroconvulsive stimulation on mossy fibre sprouting and cellular proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res* 1053: 27-32.
- Lang R, Pauleau A-L, Parganas E, Takahashi Y, Mages J, Ihle JN, Rutschman R, Murray PJ. 2003. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat. Immunol.* 4: 546-550.
- Lau CG, Zukin RS. 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8: 413-426.
- Lauritzen I, Heurteaux C, Lazdunski M. 1994. Expression of group II phospholipase A2 in rat brain after severe forebrain ischemia and in endotoxic shock. *Brain Res* 651: 353-356.
- Le Feuvre RA, Brough D, Touzani O, Rothwell NJ. 2003. Role of P2X7 receptors in ischemic and excitotoxic brain injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 381-384.
- Lee CJ, Mannaioni G, Yuan H, Woo DH, Gingrich MB, Traynelis SF. 2007a. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J Physiol* 581: 1057-1081.
- Lee H, Villacreses NE, Rapoport SI, Rosenberger TA. 2004. In vivo imaging detects a transient increase in brain arachidonic acid metabolism: a potential marker of neuroinflammation. *J Neurochem* 91: 936-945.
- Lee JC, et al. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372: 739 - 746.
- Lee TS, Bjornsen LP, Paz C, Kim JH, Spencer SS, Spencer DD, Eid T, de Lanerolle NC. 2006. GAT1 and GAT3 expression are differently localized in the human epileptogenic hippocampus. *Acta Neuropathol* 111: 351-363.
- Lee TS, Mane S, Eid T, Zhao H, Lin A, Guan Z, Kim JH, Schweitzer J, King-Stevens D, Weber P, Spencer SS, Spencer DD, de Lanerolle NC. 2007b. Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes. *Mol Med* 13: 1-13.
- Lehtimäki KA, Peltola J, Koskikallio E, Keränen T, Honkaniemi J. 2003. Expression of cytokines and cytokine receptors in the rat brain after kainic acid-induced seizures. *Mol. Brain Res.* 110: 253-260.

- Lemercier G, Carpentier P, Sentenac-Roumanou H, Morelis P. 1983. Histological and histochemical changes in the central nervous system of the rat poisoned by an irreversible anticholinesterase organophosphorus compound. *Acta Neuropathol Berl* 61: 123-129.
- Leveille F, El Gaamouch F, Gouix E, Lecocq M, Lobner D, Nicole O, Buisson A. 2008. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J* 22: 4258-4271.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678-689.
- Li C, Zienkiewicz J, Hawiger J. 2005. Interactive sites in the MyD88 Toll/interleukin (IL) 1 receptor domain responsible for coupling to the IL1beta signaling pathway. *J Biol Chem* 280: 26152-26159.
- Liang SL, Carlson GC, Coulter DA. 2006. Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. *J Neurosci* 26: 8537-8548.
- Liang X, Wu L, Wang Q, Hand T, Bilak M, McCullough L, Andreasson K. 2007. Function of COX-2 and prostaglandins in neurological disease. *J Mol Neurosci* 33: 94-99.
- Liu H, Mazarati AM, Baldwin RA, Wasterlain CG. 2003. Tackylkinin receptor trafficking in status epilepticus. *Neurology* 60: 517 (abstr).
- Liu H, Mazarati AM, Katsumori H, Sankar R, Wasterlain CG. 1999. Substance P is expressed in hippocampal principal neurons during status epilepticus and plays a critical role in the maintenance of status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5286-5291.
- Liu M, Eguchi N, Yamasaki Y, Urade Y, Hattori N, Urabe T. 2007. Focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice induces hematopoietic prostaglandin D synthase in microglia and macrophages. *Neuroscience* 145: 520-529.
- Liu M, Eguchi N, Yamasaki Y, Urade Y, Hattori N, Urabe T. 2009. Protective role of hematopoietic prostaglandin D synthase in transient focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 163: 296-307.
- Liu Z, Gatt A, Mikati M, Holmes GL. 1993. Effect of temperature on kainic acid-induced seizures. *Brain Res* 631: 51-58.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Llinas RR, Ribary U, Jeanmonod D, Kronberg E, Mitra PP. 1999. Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15222-15227.

- Loddick SA, Rothwell NJ. 1996. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 932-940.
- Losy J, Zaremba J, Skrobanski P. 2005. CXCL1 (GRO-alpha) chemokine in acute ischaemic stroke patients. *Folia Neuropathol* 43: 97-102.
- Lothman E. 1990. The biochemical basis and pathophysiology of status epilepticus. *Neurology* 40: 13-23.
- Lowenstein DH, Bleck T, Macdonald RL. 1999. It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia* 40: 120-122.
- Luscher C, Frerking M. 2001. Restless AMPA receptors: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci* 24: 665-670.
- Luster AD, Alon R, von Andrian UH. 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6: 1182-1190.
- MacEwan DJ. 2002. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14: 477-492.
- Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Beley A, Marie C, Garnier P. 2009. Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS One* 4: e8101.
- Magleby KL. 2004. Modal gating of NMDA receptors. *Trends Neurosci* 27: 231-233.
- Manley NC, Bertrand AA, Kinney KS, Hing TC, Sapolsky RM. 2007. Characterization of monocyte chemoattractant protein-1 expression following a kainate model of status epilepticus. *Brain Res* 1182: 138-143.
- Marcheselli VL, Bazan NG. 1996. Sustained induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by seizures in hippocampus. Inhibition by a platelet-activating factor antagonist. *J Biol Chem* 271: 24794-24799.
- Marchi N, Oby E, Batra A, Uva L, De Curtis M, Hernandez N, Van Boxel-Dezaire A, Najm I, Janigro D. 2007. In vivo and in vitro effects of pilocarpine: relevance to ictogenesis. *Epilepsia* 48: 1934-1946.
- Marchi N, Fan Q, Ghosh C, Fazio V, Bertolini F, Betto G, Batra A, Carlton E, Najm I, Granata T, Janigro D. 2009. Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol Dis* 33: 171-181.
- Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Haganir RL, Price DL. 1993. AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience* 53: 327-358.

- Martin MU, Falk W. 1997. The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction. *Eur Cytokine Netw* 8: 5-17.
- Masson P, Rochu D. 2009. Catalytic bioscavengers: the next generation of bioscavenger-based medical countermeasures. Pages p. 1200. in *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*.
- Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. 1994. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 25: 1469-1475.
- Mattson MP. 1997. Neuroprotective Signal Transduction: Relevance to Stroke. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 21: 193-206.
- Matute C, Domercq M, Sanchez-Gomez MV. 2006. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia* 53: 212-224.
- Matute C, Alberdi E, Ibarretxe G, Sanchez-Gomez MV. 2002. Excitotoxicity in glial cells. *Eur J Pharmacol* 447: 239-246.
- Mayberg TS, Lam AM, Matta BF, Domino KB, Winn HR. 1995. Ketamine does not increase cerebral blood flow velocity or intracranial pressure during isoflurane/nitrous oxide anesthesia in patients undergoing craniotomy. *Anesth Analg* 81: 84-89.
- Mazar J, Rogachev B, Shaked G, Ziv NY, Czeiger D, Chaimovitz C, Zlotnik M, Mukmenev I, Byk G, Douvdevani A. 2005. Involvement of adenosine in the antiinflammatory action of ketamine. *Anesthesiology* 102: 1174-1181.
- Mazarati A, Sankar R. 2006. Status epilepticus: danse macabre in a ballet of subunits. *Epilepsy Curr* 6: 102-105.
- Mazarati A, Liu H, Wasterlain C. 1999. Opioid peptide pharmacology and immunocytochemistry in an animal model of self-sustaining status epilepticus. *Neuroscience* 89: 167-173.
- Mazarati A, Baldwin RA, Sankar R, Wasterlain CG. 1998a. Time-dependent decrease in the effectiveness of antiepileptic drugs during the course of self-sustaining status epilepticus. *Brain Res* 814: 179-185.
- Mazarati A, Shin D, Auvin S, Sankar R. 2007. Age-dependent effects of topiramate on the acquisition and the retention of rapid kindling. *Epilepsia* 48: 765-773.
- Mazarati AM, Wasterlain CG. 1999. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists abolish the maintenance phase of self-sustaining status epilepticus in rat. *Neurosci Lett* 265: 187-190.

- Mazarati AM, Liu H, Soomets U, Sankar R, Shin D, Katsumori H, Langel U, Wasterlain CG. 1998b. Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. *J Neurosci* 18: 10070-10077.
- McCandless EE, Klein RS. 2007. Molecular targets for disrupting leukocyte trafficking during multiple sclerosis. *Expert Rev Mol Med* 9: 1-19.
- McColl BW, Rothwell NJ, Allan SM. 2007. Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms. *J Neurosci* 27: 4403-4412.
- McDonough JH, Shih TM. 1997. Neuropharmacological Mechanisms of Nerve Agent-induced Seizure and Neuropathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 21: 559-579.
- McDonough JH, Jr., Shih TM. 1993. Pharmacological modulation of soman-induced seizures. *Neurosci Biobehav Rev* 17: 203-215.
- McDonough JH, Jr., Dochterman LW, Smith CD, Shih TM. 1995. Protection against nerve agent-induced neuropathology, but not cardiac pathology, is associated with the anticonvulsant action of drug treatment. *Neurotoxicology* 16: 123-132.
- McDougal JN, Garrett, Carol, M., Paton, Sara, J., Cool, David, R., Grubbs, Robert, D., Sulentic, Courtney, E.W., Lucot, James, B., Price, Williams, R., Morris Mariana. 2004. Evidence of low dose effects of sarin on gene expression in mouse brain. Paper presented at USAMD review Bioscience; May 2004, Hunt-Valley, MD, USA.
- McLean MJ, Gupta RC, Dettbarn WD, Wamil AW. 1992. Prophylactic and therapeutic efficacy of memantine against seizures produced by soman in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 112: 95-103.
- Meldrum B. 1983. Endocrine consequences of status epilepticus. *Adv Neurol* 34: 399-403.
- Meldrum B. 2007. Status epilepticus: the past and the future. *Epilepsia* 48 Suppl 8: 33-34.
- Meldrum B, Horton R. 1973. Physiology of status epilepticus in primates. *Arch Neurol* 28: 1-9.
- Meldrum B, Vigouroux R, Brierley J. 1973. Systemic factors and epileptic brain damage. Prolonged seizures in paralyzed, artificially ventilated baboons. *Arch Neurol* 29: 82-87.
- Menard C, Patenaude C, Massicotte G. 2005a. Phosphorylation of AMPA receptor subunits is differentially regulated by phospholipase A2 inhibitors. *Neurosci Lett* 389: 51-56.
- Menard C, Valastro B, Martel MA, Chartier E, Marineau A, Baudry M, Massicotte G. 2005b. AMPA receptor phosphorylation is selectively regulated by constitutive phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase activities. *Hippocampus* 15: 370-380.

- Menard C, Chartier E, Patenaude C, Robinson P, Cyr M, Baudry M, Massicotte G. 2007. Calcium-independent phospholipase A(2) influences AMPA-mediated toxicity of hippocampal slices by regulating the GluR1 subunit in synaptic membranes. *Hippocampus* 17: 1109-1120.
- Miettinen S, Fusco FR, Yrjanheikki J, Keinänen R, Hirvonen T, Roivainen R, Narhi M, Hokfelt T, Koistinaho J. 1997. Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6500-6505.
- Minami M, Kuraishi Y, Satoh M. 1991. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 593-598.
- Minami M, Kuraishi Y, Yamaguchi T, Nakai S, Hirai Y, Satoh M. 1990. Convulsants induce interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 171: 832-837.
- Mion G. 2003. Effets neurophysiologiques et mécanismes d'action. Pages 17-42 in ARNETTE, ed. Ketamine. Rueil-Malmaison.
- Mion G. 2004. Effets encéphaliques de la kétamine. *Urgence Pratique* 67: 5-8.
- Mion G, Tourtier JP, Petitjeans F, Dorandeu F, Lallement G, Ruttimann M. 2003. Neuroprotective and antiepileptic activities of ketamine in nerve agent poisoning. *Anesthesiology* 98: 1517; author reply 1517-1518.
- Mohapel P, Armitage LL, Gilbert TH, Hannesson DK, Teskey GC, Corcoran ME. 2000. Mossy fiber sprouting is dissociated from kindling of generalized seizures in the guinea-pig. *Neuroreport* 11: 2897-2901.
- Mohri I, Eguchi N, Suzuki K, Urade Y, Taniike M. 2003. Hematopoietic prostaglandin D synthase is expressed in microglia in the developing postnatal mouse brain. *Glia* 42: 263-274.
- Molloy GY, Rattray M, Williams RJ. 1998. Genes encoding multiple forms of phospholipase A2 are expressed in rat brain. *Neurosci Lett* 258: 139-142.
- Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK. 1987. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem* 262: 2941-2944.
- Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K, Kudo I. 2003. Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* 278: 37937-37947.

Murakami M, Yoshihara K, Shimbara S, Lambeau G, Singer A, Gelb MH, Sawada M, Inagaki N, Nagai H, Kudo I. 2002. Arachidonate release and eicosanoid generation by group IIE phospholipase A(2). *Biochem Biophys Res Commun* 292: 689-696.

Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. 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.

Nacher J, S. MB, McEwen BS. 2006. The role of N-methyl-D-aspartate receptors in neurogenesis. *Hippocampus*. 16: 267-270.

Naffah-Mazzacoratti MG, Bellissimo MI, Cavalheiro EA. 1995. Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Int* 27: 461-466.

Nakanishi M, Mori T, Nishikawa K, Sawada M, Kuno M, Asada A. 2007. The effects of general anesthetics on P2X7 and P2Y receptors in a rat microglial cell line. *Anesth Analg* 104: 1136-1144, tables of contents.

Navarro F. 2006. Transmission non synaptique et synchronies : quels rôles dans l'activité épileptique ? *Neurologies* 9: 539-543.

Navarro F. 2007. Inflammation et infiltration monocytaire associés à la dégénérescence neuronale induite par un status epilepticus chez le rat. *Physiologie et neuroscience* Doctorate. Lyon, p. 215.

Naylor DE, Liu H, Wasterlain CG. 2005. Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *J Neurosci* 25: 7724-7733.

Neligan A, Shorvon SD. 2010. Frequency and prognosis of convulsive status epilepticus of different causes: a systematic review. *Arch Neurol* 67: 931-940.

Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ullrich O, Reymann KG, Dinkel K. 2006. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J* 20: 714-716.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314-1318.

Nishina K, Akamatsu H, Mikawa K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, Niwa Y. 1998. The inhibitory effects of thiopental, midazolam, and ketamine on human neutrophil functions. *Anesth Analg* 86: 159-165.

Niswender CM, Conn PJ. 2010. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 295-322.

- Noda M, Nakanishi H, Nabekura J, Akaike N. 2000. AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J. Neurosci.* 20: 251-258.
- Norris JG, Benveniste EN. 1993. Interleukin-6 production by astrocytes: induction by the neurotransmitter norepinephrine. *J Neuroimmunol* 45: 137-145.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-465.
- O'Banion MK. 1999. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* 13: 45-82.
- Oliet SH, R. P, Piet R, A. PD, Poulain DA. 2001. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science.* 292: 923-926.
- Olney JW, Collins RC, Sloviter RS. 1986. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. Pages 857-877 in Delgado-Escueta AV, Ward AA, Woodbury DM, Porter RJ, eds. *Advances in Neurology*, vol. 44. New York: Raven Press.
- Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. 2003. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol* 111: 1185-1199.
- Oprica M, Eriksson C, Schultzberg M. 2003. Inflammatory mechanisms associated with brain damage induced by kainic acid with special reference to the interleukin-1 system. *J Cell Mol Med* 7: 127-140.
- Outin H. 2009. Generalized convulsive status epilepticus in emergency situations in and out of hospital. *Presse Med* 38: 1823-1831.
- Outin H, Blanc T, Vinatier I. 2009. Emergency and intensive care unit management of status epilepticus in adult patients and children (new-born excluded). *Societe de reanimation de langue francaise experts recommendations. Rev Neurol (Paris)* 165: 297-305.
- Owada Y, Tominaga T, Yoshimoto T, Kondo H. 1994. Molecular cloning of rat cDNA for cytosolic phospholipase A2 and the increased gene expression in the dentate gyrus following transient forebrain ischemia [*Molecular Brain Research* 25 (1994) 364-368]. *Brain Res Mol Brain Res* 27: 355.
- Pal S, Sombati S, Limbrick DD, Jr., DeLorenzo RJ. 1999. In vitro status epilepticus causes sustained elevation of intracellular calcium levels in hippocampal neurons. *Brain Res* 851: 20-31.
- Pan W, Kastin AJ, Daniel J, Yu C, Baryshnikova LM, von Bartheld CS. 2007. TNFalpha trafficking in cerebral vascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* 185: 47-56.

- Panegyres PK, 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. *J Neurol Sci* 154: 123-132.
- Pantoni L, Sarti C, Inzitari D. 1998. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 503-513.
- Paoletti P, Neyton J. 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7: 39-47.
- Parent JM, Murphy GG. 2008. Mechanisms and functional significance of aberrant seizure-induced hippocampal neurogenesis. *Epilepsia* 49 Suppl 5: 19-25.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 3727-3738.
- Park C, Lee S, Cho IH, Lee HK, Kim D, Choi SY, Oh SB, Park K, Kim JS, Lee SJ. 2006. TLR3-mediated signal induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in astrocytes: differential signaling mechanisms of TLR3-induced IP-10 and IL-8 gene expression. *Glia* 53: 248-256.
- Patel NC, Landan IR, Levin J, Szaflarski J, Wilner AN. 2006. The use of levetiracetam in refractory status epilepticus. *Seizure* 15: 137-141.
- Pease JE, Williams TJ. 2006. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S212-221.
- Pellerin L, Magistretti PJ. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10625-10629.
- Penkowa M, Molinero A, Carrasco J, 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, Hidalgo J. 1999. Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 25: 343-357.
- Pernot F. 2009. Evénement moléculaires et cellulaires associés à l'épileptogénèse dans deux modèles murins d'injection intrahippocampique de toxiques. Implication des mécanismes neuro-inflammatoires. Pages 227. Toxicologie et neuroscience Doctorate.

- Pernot F, Dorandeu F, Beaup C, Peinnequin A. 2010. Selection of reference genes for real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in hippocampal structure in a murine model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. *J Neurosci Res* 88: 1000-1008.
- Phillips JB, Williams AJ, Adams J, Elliott PJ, Tortella FC. 2000. Proteasome inhibitor PS519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 31: 1686-1693.
- Pinheiro P, Mulle C. 2006. Kainate receptors. *Cell Tissue Res* 326: 457-482.
- Pinteaux E, Rothwell NJ, Boutin H. 2006. Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia. *Glia* 53: 551-556.
- Pitkanen A, McIntosh TK. 2006. Animal models of post-traumatic epilepsy. *J Neurotrauma* 23: 241-261.
- Pitkanen A, Kharatishvili I, Karhunen H, Lukasiuk K, Immonen R, Nairismagi J, Grohn O, Nissinen J. 2007. Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia* 48 Suppl 2: 13-20.
- Ponomarev ED, Shriver LP, Dittel BN. 2006. CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation. *J Immunol* 176: 1402-1410.
- Porter JT, McCarthy KD, Hirayama M, Kuriyama M. 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo MK-801 is cytotoxic to microglia in vitro and its cytotoxicity is attenuated by glutamate, other excitotoxic agents and atropine. Possible presence of glutamate receptor and muscarinic receptor on microglia. *Prog Neurobiol.* 51: 439-455.
- Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. 1995. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11294-11298.
- Quintana A, Giralt M, Rojas S, Penkowa M, Campbell IL, Hidalgo J, Molinero A. 2005. Differential role of tumor necrosis factor receptors in mouse brain inflammatory responses in cryolesion brain injury. *J Neurosci Res* 82: 701-716.
- Raivich G, Bohatschek M, Werner A, Jones LL, Galiano M, Kloss CU, Zhu XZ, Pfeffer K, Liu ZQ. 2003. Lymphocyte infiltration in the injured brain: role of proinflammatory cytokines. *J Neurosci Res* 72: 726-733.
- Rakic P. 1998. Young neurons for old brains? *Nat Neurosci* 1: 645-647.
- Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 3: 569-581.

Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M. 1998. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 4: 814-821.

Rath PC, Aggarwal BB. 1999. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 19: 350-364.

Ravizza T, Vezzani A. 2006. Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system. *Neuroscience* 137: 301-308.

Ravizza T, Gagliardi B, Noe F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. 2008. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 29: 142-160.

Ravizza T, Rizzi M, Perego C, Richichi C, Veliskova J, Moshe SL, De Simoni MG, Vezzani A. 2005. Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia* 46 Suppl 5: 113-117.

Rebenko-Moll NM, Liu L, Cardona A, Ransohoff RM. 2006. Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 683-689.

Reynolds LJ, Hughes LL, Yu L, Dennis EA. 1994. 1-Hexadecyl-2-arachidonoylthio-2-deoxy-sn-glycero-3-phosphorylcholine as a substrate for the microtiterplate assay of human cytosolic phospholipase A2. *Anal Biochem* 217: 25-32.

Riazi K, Galic MA, Kuzmiski JB, Ho W, Sharkey KA, Pittman QJ. 2008. Microglial activation and TNFalpha production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17151-17156.

Richebe P, Rivat C, Rivalan B, Maurette P, Simonnet G. 2005. Low doses ketamine: antihyperalgesic drug, non-analgesic. *Ann Fr Anesth Reanim* 24: 1349-1359.

Rigau V, Morin M, Rousset MC, de Bock F, Lebrun A, Coubes P, Picot MC, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Crespel A, Lerner-Natoli M. 2007. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain* 130: 1942-1956.

Rijkers K, Majoie HJ, Hoogland G, Kenis G, De Baets M, Vles JS. 2009. The role of interleukin-1 in seizures and epilepsy: a critical review. *Exp Neurol* 216: 258-271.

Rivest S, Lacroix S, Vallieres L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. 2000. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 223: 22-38.

Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KC, Yin L, Pennica D, Johnson EM, Jr., Schreiber RD. 1998. Disruption of the Jak1 gene

demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 93: 373-383.

Rolls A, Shechter R, Schwartz M. 2009. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci* 10: 235-241.

Rondouin G, Lallement G, Lerner-Natoli M. 1993. Soman-induced epilepsy: Electroclinical patterns, biochemical and morphological characteristics. *Epilepsia* 54 (suppl. 2): 101.

Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. 2006. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 80: 227-236.

Rose TM, Bruce AG. 1991. Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8641-8645.

Rosell DR, Nacher J, Akama KT, McEwen BS. 2003. Spatiotemporal distribution of gp130 cytokines and their receptors after status epilepticus: comparison with neuronal degeneration and microglial activation. *Neuroscience* 122: 329-348.

Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF. 1998. The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280: 1596-1599.

Rothstein JD, et al. 2005. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*. 433: 73-77.

Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322: 1551-1555.

Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, Carpen O, Siren A-L. 2001. Differential cellular expression of tumor necrosis factor-[alpha] and Type I tumor necrosis factor receptor after transient global forebrain ischemia. *J. Neurol. Sci.* 186: 87-99.

Sakai T, Ichiyama T, Whitten CW, Giesecke AH, Lipton JM. 2000. Ketamine suppresses endotoxin-induced NF-kappaB expression. *Can. J. Anaesth.* 47: 1019-1024.

Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ. 2001. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410: 471-475.

Samland H, Huitron-Resendiz S, Masliah E, Criado J, Henriksen SJ, Campbell IL. 2003. Profound increase in sensitivity to glutamatergic- but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. *J Neurosci Res* 73: 176-187.

- Sandhya TL, Ong WY, Horrocks LA, Farooqui AA. 1998. A light and electron microscopic study of cytoplasmic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in the hippocampus after kainate lesions. *Brain Res* 788: 223-231.
- Sankar R, Auvin S, Shin D, Mazarati A. 2007. Inflammation modifies status epilepticus-induced hippocampal injury during development. *Epilepsia* 48 Suppl 8: 16-18.
- Santi SA, Cook LL, Persinger MA, O'Connor RP. 2001. Normal spatial memory following postseizure treatment with ketamine: selective damage attenuates memory deficits in brain-damaged rodents. *Int J Neurosci* 107: 63-75.
- Santos SD, Carvalho AL, Caldeira MV, Duarte CB. 2009. Regulation of AMPA receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 158: 105-125.
- Sanz O, Estrada A, Ferrer I, Planas AM. 1997. Differential cellular distribution and dynamics of HSP70, cyclooxygenase-2, and c-Fos in the rat brain after transient focal ischemia or kainic acid. *Neuroscience* 80: 221-232.
- Sarton E, Teppema LJ, Olievier C, Nieuwenhuijs D, Matthes HW, Kieffer BL, Dahan A. 2001. The involvement of the mu-opioid receptor in ketamine-induced respiratory depression and antinociception. *Anesth Analg* 93: 1495-1500, table of contents.
- Scheller J, Rose-John S. 2006. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol* 195: 173-183.
- Scher JU, Pillinger MH. 2009. The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *J Investig Med* 57: 703-708.
- Schwartz M, Butovsky O, Bruck W, Hanisch UK. 2006. Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci* 29: 68-74.
- Seifert G, Carmignoto G, Steinhauser C. 2010. Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Res Rev* 63: 212-221.
- Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, Friedman A. 2004. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 24: 7829-7836.
- Sevaljevic L, Poznanovic G, Ivanovic-Matic S. 1992. The acute phase response of rats to soman intoxication. *Toxicology* 75: 1-12.
- Sevaljevic L, Krtolica K, Poznanovic G, Marinkovic S, Boskovic B. 1987. Soman intoxication-induced increase in the levels of mRNAs coding for acute phase reactants. *Life Sci* 41: 621-627.

Shaftel SS, Griffin WS, O'Banion MK. 2008. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation* 5: 7.

Shaftel SS, Carlson TJ, Olschowka JA, Kyrkanides S, Matousek SB, O'Banion MK. 2007. Chronic interleukin-1 β expression in mouse brain leads to leukocyte infiltration and neutrophil-independent blood brain barrier permeability without overt neurodegeneration. *J Neurosci* 27: 9301-9309.

Shapiro LA, Wang L, Ribak CE. 2008. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia* 49 Suppl 2: 33-41.

Sharma AK, Jordan WH, Reams RY, Hall DG, Snyder PW. 2008. Temporal profile of clinical signs and histopathologic changes in an F-344 rat model of kainic acid-induced mesial temporal lobe epilepsy. *Toxicol Pathol* 36: 932-943.

Sharp FR, Hendren RL. 2007. Psychosis: atypical limbic epilepsy versus limbic hyperexcitability with onset at puberty? *Epilepsy Behav* 10: 515-520.

Sheth RD, Gidal BE. 1998. Refractory status epilepticus: response to ketamine. *Neurology* 51: 1765-1766.

Shibakawa YS, Sasaki Y, Goshima Y, Echigo N, Kamiya Y, Kurahashi K, Yamada Y, Andoh T. 2005. Effects of ketamine and propofol on inflammatory responses of primary glial cell cultures stimulated with lipopolysaccharide. *Br J Anaesth* 95: 803-810.

Shih TM. 1982. Time course effects of soman on acetylcholine and choline levels in six discrete areas of the rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* 78: 170-175.

Shih TM. 1990. Anticonvulsant effects of diazepam and MK-801 in soman poisoning. *Epilepsy Res* 7: 105-116.

Shih TM, McDonough JH, Jr. 1997. Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. *J Appl Toxicol* 17: 255-264.

Shih TM, McDonough JH, Koplovitz I. 1999. Anticonvulsants for soman-induced seizure activity. *J Biomed Sci* 6: 86-96.

Shih TM, Duniho SM, McDonough JH. 2003. Control of nerve agent-induced seizures is critical for neuroprotection and survival. *Toxicology and Applied Pharmacology* 188: 69-80.

Shimaoka M, Lida T, Ohara A, Taenaka N, Mashimo T, Honda T, Yoshiya I. 1996. Ketamine inhibits nitric oxide production in mouse-activated macrophage-like cells. *Br. J. Anaesth.* 77: 238-242.

Siebzehnrbubl FA, Blumcke I. 2008. Neurogenesis in the human hippocampus and its relevance to temporal lobe epilepsies. *Epilepsia* 49 Suppl 5: 55-65.

- Simon RP. 1985. Physiologic consequences of status epilepticus. *Epilepsia* 26 Suppl 1: S58-66.
- Sims JE. 2002. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr Opin Immunol* 14: 117-122.
- Sinner B, Graf BM. 2008. Ketamine. *Handb Exp Pharmacol*: 313-333.
- Six DA, Dennis EA. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1488: 1-19.
- Sloviter RS. 1987. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 235: 73-76.
- Sloviter RS. 2005. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *C R Biol* 328: 143-153.
- Sloviter RS, Dempster DW. 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 Res* 15: 39-60.
- Soares DM, Machado RR, Yamashiro LH, Melo MC, Souza GE. 2008. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 induces fever by a prostaglandin-dependent mechanism in rats. *Brain Res* 1233: 79-88.
- Sofroniew MV. 2005. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 11: 400-407.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35.
- Song I, Huganir RL. 2002. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 25: 578-588.
- Sparenborg S. 1991. Neurons are rescued from soman-induced brain damage by the neuroprotectant MK-801 after two hours of status epilepticus. *Med Def Biosci Rev*: 465-469.
- Sparenborg S, Brennecke LH, Beers ET. 1993. Pharmacological dissociation of the motor and electrical aspects of convulsive status epilepticus induced by the cholinesterase inhibitor soman. *Epilepsy Res* 14: 95-103.
- Sparenborg S, Brennecke LH, Jaax NK, Braitman DJ. 1992. Dizocilpine (MK-801) arrests status epilepticus and prevents brain damage induced by soman. *Neuropharmacology* 31: 357-368.

Sperk G. 2007. Changes in GABAA receptors in status epilepticus. *Epilepsia* 48 Suppl 8: 11-13.

Sperk G, Wieser R, Widmann R, Singer EA. 1986. Kainic acid induced seizures: changes in somatostatin, substance P and neurotensin. *Neuroscience* 17: 1117-1126.

Spreato R, Frassonni C, Arcelli P, Battaglia G, Wenthold RJ, De Biasi S. 1994. Distribution of AMPA selective glutamate receptors in the thalamus of adult rats and during postnatal development. A light and ultrastructural immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* 82: 231-244.

Srinivasan D, Yen JH, Joseph DJ, Friedman W. 2004. Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. *J Neurosci* 24: 6482-6488.

Stafstrom CE. 2010. Mechanisms of action of antiepileptic drugs: the search for synergy. *Curr Opin Neurol* 23: 157-163.

Stamatovic SM, Shaku P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV. 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 593-606.

Stefini R, Catenacci E, Piva S, Sozzani S, Valerio A, Bergomi R, Cenzato M, Mortini P, Latronico N. 2008. Chemokine detection in the cerebral tissue of patients with posttraumatic brain contusions. *J Neurosurg* 108: 958-962.

Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC. 2005. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci* 25: 3219-3228.

Stewart LS, Persinger MA. 2001. Ketamine Prevents Learning Impairment When Administered Immediately after Status Epilepticus Onset. *Epilepsy Behav* 2: 585-591.

Strauss KI. 2008. Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX2 inhibitors in the injured brain. *Brain Behav Immun* 22: 285-298.

Strauss KI, Marini AM. 2002. Cyclooxygenase-2 inhibition protects cultured cerebellar granule neurons from glutamate-mediated cell death. *J Neurotrauma* 19: 627-638.

Strauss KI, Barbe MF, Marshall RM, Raghupathi R, Mehta S, Narayan RK. 2000. Prolonged cyclooxygenase-2 induction in neurons and glia following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 17: 695-711.

Streit WJ, Kreutzberg GW. 1987. Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol* 16: 249-260.

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57: 563-581.

- Stroemer RP, Rothwell, N.J. 1998. Exacerbation of ischemic brain damage by localised striatal injection of interleukin-1b in rta. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 833-839.
- Sun GY, Hu ZY. 1995. Stimulation of phospholipase A2 expression in rat cultured astrocytes by LPS, TNF alpha and IL-1 beta. *Prog Brain Res* 105: 231-238.
- Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. 2004. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* 45: 205-213.
- Sun GY, Xu J, Jensen MD, Yu S, Wood WG, Gonzalez FA, Simonyi A, Sun AY, Weisman GA. 2005. Phospholipase A2 in astrocytes: responses to oxidative stress, inflammation, and G protein-coupled receptor agonists. *Mol Neurobiol* 31: 27-41.
- Suzuki F, Hirai H, Onteniente B, Riban V, Matsuda M, Kurokawa K. 2000. Long-term increase of GluR2 alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptor subunit in the dispersed dentate gyrus after intrahippocampal kainate injection in the mouse. *Neuroscience* 101: 41-50.
- Suzuki F, Heinrich C, Boehrer A, Mitsuya K, Kurokawa K, Matsuda M, Depaulis A. 2005. Glutamate receptor antagonists and benzodiazepine inhibit the progression of granule cell dispersion in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 46: 193-202.
- Svensson I, Waara L, Cassel G. 2005. Effects of HI 6, Diazepam and Atropine on Soman-Induced IL-1[beta] Protein in Rat Brain. *Neurotoxicology* 26: 173-181.
- Svensson I, Waara L, Johansson L, Bucht A, Cassel G. 2001. Soman-induced interleukin-1 beta mRNA and protein in rat brain. *Neurotoxicology* 22: 355-362.
- Szelenyi J. 2001. Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull* 54: 329-338.
- Szmydynger-Chodobska J, Strazielle N, Zink BJ, Ghersi-Egea JF, Chodobski A. 2009. The role of the choroid plexus in neutrophil invasion after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 1503-1516.
- Takahashi H, Matsumoto H, Smirkin A, Itai T, Nishimura Y, Tanaka J. 2008. Involvement of heparanase in migration of microglial cells. *Biochim Biophys Acta* 1780: 709-715.
- Takemiya T, Matsumura K, Yamagata K. 2007. Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases. *Neurochem Int* 51: 112-120.
- Takemiya T, Maehara M, Matsumura K, Yasuda S, Sugiura H, Yamagata K. 2006. Prostaglandin E2 produced by late induced COX-2 stimulates hippocampal neuron loss after seizure in the CA3 region. *Neurosci Res* 56: 103-110.

Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Maehara M, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K. 2010. Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 exacerbates neuronal loss induced by kainate. *J Neurosci Res* 88: 381-390.

Takenaka I, Ogata M, Koga K, Matsumoto T, Shigematsu A. 1994. Ketamine suppresses endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production in mice. *Anesthesiology* 80: 402-408.

Tanaka H, Y. GS, Grooms SY, V. BM, Bennett MV, S. ZR, Zukin RS. 2000. The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. *Brain Res.* 886: 190-207.

Taniguchi H, Mohri I, Okabe-Arahoru H, Kanekiyo T, Kagitani-Shimono K, Wada K, Urade Y, Nakayama M, Ozono K, Taniike M. 2007. Early induction of neuronal lipocalin-type prostaglandin D synthase after hypoxic-ischemic injury in developing brains. *Neurosci Lett* 420: 39-44.

Taniguchi T, Takemoto Y, Kanakura H, Kidani Y, Yamamoto K. 2003. The dose-related effects of ketamine on mortality and cytokine responses to endotoxin-induced shock in rats. *Anesth Analg* 97: 1769-1772.

Taniwaki Y, Kato M, Araki T, Kobayashi T. 1996. Microglial activation by epileptic activities through the propagation pathway of kainic acid-induced hippocampal seizures in the rat. *Neurosci Lett* 217: 29-32.

Thomas DM, Kuhn DM. 2005. MK-801 and dextromethorphan block microglial activation and protect against methamphetamine-induced neurotoxicity. *Brain Res.*: 190-198.

Thorns V, Walter GF, Licastro F. 2002. Effects of IL6 and IL1beta on aFGF expression and excitotoxicity in NT2N cells. *J Neuroimmunol* 127: 22-29.

Tocco G, Freire-Moar J, Schreiber SS, Sakhi SH, Aisen PS, Pasinetti GM. 1997. Maturational regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 144: 339-349.

Tokime T, Nozaki K, Kikuchi H. 1996. Neuroprotective effect of FK506, an immunosuppressant, on transient global ischemia in gerbil. *Neurosci Lett* 206: 81-84.

Towne AR, Garnett LK, Waterhouse EJ, Morton LD, DeLorenzo RJ. 2003. The use of topiramate in refractory status epilepticus. *Neurology* 60: 332-334.

Treiman DM. 1999. Convulsive Status Epilepticus. *Curr Treat Options Neurol* 1: 359-369.

Treiman DM. 2001. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42 Suppl 3: 8-12.

Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8: e1000527.

- Trettel F, Di Angelantonio S, Limatola C, Ransohoff RM. 2008. Chemokines and chemokine receptors in the nervous system Rome, 27/28 October, 2007. *J Neuroimmunol* 198: 1-8.
- Triggiani M, Granata F, Frattini A, Marone G. 2006. Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta* 1761: 1289-1300.
- Tsai SK, Liao KT, Lee CM. 1992. Modification by ketamine on the neuromuscular actions of magnesium, vecuronium, pancuronium and alpha-bungarotoxin in the primate. *Can J Anaesth* 39: 79-82.
- Turowski P, Adamson P, Greenwood J. 2005. Pharmacological targeting of ICAM-1 signaling in brain endothelial cells: potential for treating neuroinflammation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25: 153-170.
- Turrin NP, Rivest S. 2004. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol Dis* 16: 321-334.
- Ubogu EE, Callahan MK, Tucky BH, Ransohoff RM. 2006. Determinants of CCL5-driven mononuclear cell migration across the blood-brain barrier. Implications for therapeutically modulating neuroinflammation. *J Neuroimmunol* 179: 132-144.
- Uesaka N, S. RE, Ruthazer ES, Nobuhiko Y, Yamamoto N. 2006. The role of neural activity in cortical axon branching. *Neuroscientist*. 12: 102-106.
- Uva L, Librizzi L, Marchi N, Noe F, Bongiovanni R, Vezzani A, Janigro D, de Curtis M. 2008. Acute induction of epileptiform discharges by pilocarpine in the in vitro isolated guinea-pig brain requires enhancement of blood-brain barrier permeability. *Neuroscience* 151: 303-312.
- van Gassen KL, de Wit M, Koerkamp MJ, Rensen MG, van Rijen PC, Holstege FC, Lindhout D, de Graan PN. 2008. Possible role of the innate immunity in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 49: 1055-1065.
- van Vliet EA, da Costa Araujo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. 2007. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 130: 521-534.
- Van Wagoner NJ, Benveniste EN. 1999. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol* 100: 124-139.
- Van Wagoner NJ, Oh JW, Repovic P, Benveniste EN. 1999. Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. *J Neurosci* 19: 5236-5244.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: 34.31-34.11.

- Vezzani, Baram TZ. 2007. New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Curr* 7: 45-50.
- Vezzani, Conti M, De Luigi A, Ravizza T, Moneta D, Marchesi F, De Simoni MG. 1999a. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J. Neurosci.* 19: 5054-5065.
- Vezzani A, Granata T. 2005. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46: 1724-1743.
- Vezzani A, Ravizza T, Balosso S, Aronica E. 2008. Glia as a source of cytokines: implications for neuronal excitability and survival. *Epilepsia* 49 Suppl 2: 24-32.
- Vezzani A, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Borroni A, Rizzi M, Samanin R, Maj R. 1999b. Brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the limbic system of rats after acute seizures and during spontaneous convulsions: temporal evolution of changes as compared to neuropeptide Y. *Neuroscience* 90: 1445-1461.
- Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows SJ, Ravizza T, Perego C, DeSimoni MG. 2002. Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia* 43: 30-35.
- Vezzani A, Moneta D, Conti M, Richichi C, Ravizza T, De Luigi A, De Simoni MG, Sperk G, Andell-Jonsson S, Lundkvist J, Iverfeldt K, Bartfai T. 2000. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11534-11539.
- Vignatelli L, Tonon C, D'Alessandro R. 2003. Incidence and short-term prognosis of status epilepticus in adults in Bologna, Italy. *Epilepsia* 44: 964-968.
- Vincent P, Mulle C. 2009. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158: 309-323.
- Viola A, Luster AD. 2008. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 171-197.
- Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C. 2000a. "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74: 457-471.
- Vitkovic L, Konsman JP, Bockaert J, Dantzer R, Homburger V, Jacque C. 2000b. Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry* 5: 604-615.
- Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, Galli CL, Marinovich M. 2004. Cytokines role in neurodegenerative events. *Toxicol Lett* 149: 85-89.

- Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzaini A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di Luca M, Galli CL, Marinovich M. 2003. Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* 23: 8692-8700.
- Wade JV, Samson FE, Nelson SR, Pazdernik TL. 1987. Changes in extracellular amino acids during soman- and kainic acid-induced seizures. *J Neurochem* 49: 645-650.
- Wagner LE, Gingrich KJ, Kulli JC, Yang J. 2001. Ketamine blockade of voltage-gated sodium channels: evidence for a shared receptor site with local anesthetics. *Anesthesiology* 95: 1406-1413.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45-65.
- Walker M. 2007. Neuroprotection in epilepsy. *Epilepsia* 48 Suppl 8: 66-68.
- Wang CX, Shuaib A. 2002. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol* 67: 161-172.
- Wang S, Cheng Q, Malik S, Yang J. 2000. Interleukin-1 β inhibits gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 497-504.
- Wang X, Barone FC, Aiyar NV. 1997. Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rat. *Stroke* 28: 155-161.
- Wang X, Tang XN, Yenari MA. 2007. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184: 53-68.
- Wanner IB, Deik A, Torres M, Rosendahl A, Neary JT, Lemmon VP, Bixby JL. 2008. A new in vitro model of the glial scar inhibits axon growth. *Glia* 56: 1691-1709.
- Warner TD, Mitchell JA. 2004. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J* 18: 790-804.
- Wasterlain CG. 1974. Inhibition of cerebral protein synthesis by epileptic seizures without motor manifestations. *Neurology* 24: 175-180.
- Wasterlain CG, Chen JW. 2008. Mechanistic and pharmacologic aspects of status epilepticus and its treatment with new antiepileptic drugs. *Epilepsia* 49 Suppl 9: 63-73.
- Wasterlain CG, Mazarati A, Baldwin RA. 2002a. NMDA receptor trafficking during the transition from single seizures to status epilepticus. *Ann Neurol* 52.

Wasterlain CG, Fujikawa DG, Penix L, Sankar R. 1993. Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus. *Epilepsia* 34 Suppl 1: S37-53.

Wasterlain CG, Bronstein JM, Morin AM, Dwyer BE, Sankar R. 1992. Translocation and autophosphorylation of brain calmodulin kinase II in status epilepticus. *Epilepsy Res Suppl* 9: 231-238.

Wasterlain CG, Mazarati AM, Naylor D, Niquet J, Liu H, Suchomelova L, Baldwin R, Katsumori H, Shirasaka Y, Shin D, Sankar R. 2002b. Short-term plasticity of hippocampal neuropeptides and neuronal circuitry in experimental status epilepticus. *Epilepsia* 43 Suppl 5: 20-29.

Werz O. 2002. 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1: 23-44.

Wetherington J, Serrano G, Dingleline R. 2008. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* 58: 168-178.

White PF, Way WL, Trevor AJ. 1982. Ketamine--its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology* 56: 119-136.

White RP, Hagen AA. 1982. Cerebrovascular actions of prostaglandins. *Pharmacol Ther* 18: 313-331.

Wilding TJ, Huettner JE. 2001. Functional diversity and developmental changes in rat neuronal kainate receptors. *J Physiol* 532: 411-421.

Williams AJ, Berti R, Yao C, Price RA, Velarde LC, Koplovitz I, Schultz SM, Tortella FC, Dave JR. 2003. Central neuro-inflammatory gene response following soman exposure in the rat. *Neurosci. Lett.* 349: 147-150.

Won SJ, Ko HW, Kim EY, Park EC, Huh K, Jung NP, Choi I, Oh YK, Shin HC, Gwag BJ. 1999. Nuclear factor kappa B-mediated kainate neurotoxicity in the rat and hamster hippocampus. *Neuroscience* 94: 83-91.

Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. 2007. Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability. *J. Neuroimmunol.* 184: 136-148.

Xu JH, Long L, Tang YC, Zhang JT, Hut HT, Tang FR. 2009. CCR3, CCR2A and macrophage inflammatory protein (MIP)-1a, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the mouse hippocampus during and after pilocarpine-induced status epilepticus (PISE). *Neuropathol Appl Neurobiol* 35: 496-514.

Yamagata K, Matsumura K, Inoue W, Shiraki T, Suzuki K, Yasuda S, Sugiura H, Cao C, Watanabe Y, Kobayashi S. 2001. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase

with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci* 21: 2669-2677.

Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. 1995. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke; a Journal Of Cerebral Circulation* 26: 676-680; discussion 681.

Yamasaki Y, Matsuo Y, Zagorski J, Matsuura N, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. 1997. New therapeutic possibility of blocking cytokine-induced neutrophil chemoattractant on transient ischemic brain damage in rats. *Brain Res* 759: 103-111.

Yang XP, Schaper F, Teubner A, Lammert F, Heinrich PC, Matern S, Siewert E. 2005. Interleukin-6 plays a crucial role in the hepatic expression of SOCS3 during acute inflammatory processes in vivo. *J Hepatol* 43: 704-710.

Ye ZC, Sontheimer H. 1996. Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. *Neuroreport* 7: 2181-2185.

Yoshimura A, Naka T, Kubo M. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7: 454-465.

Yudkoff M, Nissim I, Daikhin Y, Lin ZP, Nelson D, Pleasure D, Erecinska M. 1993. Brain glutamate metabolism: neuronal-astroglial relationships. *Dev Neurosci* 15: 343-350.

Zawadzka M, Kaminska B. 2005. A novel mechanism of FK506-mediated neuroprotection: downregulation of cytokine expression in glial cells. *Glia* 49: 36-51.

Zhang L, McLarnon JG, Goghari V, Lee YB, Kim SU, Krieger C. 1998a. Cholinergic agonists increase intracellular Ca²⁺ in cultured human microglia. *Neuroscience Letters* 255: 33-36.

Zhang Z, Chopp M, Goussev A, Powers C. 1998b. Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia. *Brain Res* 784: 210-217.

Zhao CS, Overstreet-Wadiche L. 2008. Integration of adult generated neurons during epileptogenesis. *Epilepsia* 49 Suppl 5: 3-12.

Zhao J, Peng Y, Xu Z, Chen RQ, Gu QH, Chen Z, Lu W. 2008. Synaptic metaplasticity through NMDA receptor lateral diffusion. *J Neurosci* 28: 3060-3070.

Zimmer LA, Ennis M, Shipley MT. 1997. Soman-induced seizures rapidly activate astrocytes and microglia in discrete brain regions. *J. Comp. Neurol.* 378: 482-492.

Résumé

Les dommages cellulaires consécutifs à l'EME induits par une intoxication par le soman sont accompagnés par une réaction neuro-inflammatoire dont les conséquences sur les lésions cérébrales restent mal connues. Les antagonistes du récepteur glutamatergique NMDA, comme la kétamine (KET), ont prouvé leur efficacité antiépileptique et neuroprotectrice même pendant la période réfractaire au traitement par benzodiazépines, au-delà de 10 à 20 min après le début des crises. La KET semble posséder également une action anti-inflammatoire périphérique. Pour compléter les données existantes, nous avons évalué l'impact de l'intoxication sur la réponse inflammatoire au moyen de différentes approches (RT-qPCR, dosages protéiques multiplex, histologie) dans le cortex et l'hippocampe de souris intoxiquées par le soman. Afin d'étudier l'efficacité de la KET sur la neuro-inflammation induite, nous avons mesuré, 48 h après l'intoxication, les effets de deux combinaisons de KET associée au sulfate d'atropine (SA) administrées à partir de 30 min ou 60 min après l'intoxication sur l'évolution de la masse corporelle, les dommages cérébraux, l'activation gliale et les taux des ARNm et des protéines de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhésion. Après intoxication par le soman, nous avons mis en évidence une importante activation gliale et une augmentation des ARNm et des protéines de la plupart des médiateurs de l'inflammation étudiés. Les deux protocoles KET/SA ont montré une importante efficacité neuroprotectrice sans totalement supprimer la gliose mais en limitant la production des paramètres inflammatoires étudiés. En conclusion, nos résultats indiquent que de multiples voies inflammatoires sont activées après l'intoxication par le soman. L'utilisation d'une combinaison KET/SA est neuroprotectrice et limite la réponse inflammatoire même lorsque le début du traitement est retardé une heure après l'intoxication.

Abstract

Epileptic seizures, status epilepticus (SE) and seizure-related brain damage (SRBD) due to organophosphorus nerve agent (OP) poisoning are accompanied by neuro-inflammatory events whose role in SRBD is not clear. Antagonists of the glutamatergic receptor NMDA, such as ketamine (KET), proved to be antiepileptic and neuroprotective even when SE is refractory to benzodiazepines 10 to 20 min after the initiation of seizures. Moreover, peripheral anti-inflammatory properties of KET have been described. To complement existing data, we studied the impact of soman poisoning on neuro-inflammatory response in murine cortex and hippocampus using different approaches (RT-qPCR, multiplex protein assays, histology). To assess the efficacy of KET on soman-induced neuro-inflammation 48 h after challenge, we determined the effects of two combinations of KET with atropine sulphate (KET/AS), administered either starting at 30 or 60 min post-challenge, on body weight loss, brain damage, and glial activation in the same brain areas. We also assessed their effects on inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules (mRNA levels and protein content). After soman poisoning, we confirmed a massive microglial and astroglial activation and showed an increase of the mRNA and related protein levels for most of the inflammatory mediators studied. Both KET/AS treatment regimens proved highly neuroprotective but only partially suppressed glial activation. KET/AS also efficiently reduced the increase in mRNA and related pro-inflammatory markers provoked by the poisoning. As a conclusion, our results indicate that multiple inflammatory pathways are activated after soman poisoning. The present study also confirms that KET/AS treatment, even delayed up to one hour, is neuroprotective and limits the neuro-inflammatory response after soman intoxication.