



HAL
open science

Etude de deux lignées de souris sélectionnées pour leur différence de réponse à la méthionine sulfoximine

Arnaud Boissonnet

► **To cite this version:**

Arnaud Boissonnet. Etude de deux lignées de souris sélectionnées pour leur différence de réponse à la méthionine sulfoximine. Médecine humaine et pathologie. Université d'Orléans, 2011. Français. NNT : 2011ORLE2023 . tel-00661297

HAL Id: tel-00661297

<https://theses.hal.science/tel-00661297>

Submitted on 19 Jan 2012

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 D'ORLÉANS



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Laboratoire de Neurobiologie / GLYcoDiag

THÈSE présentée par :
Arnaud BOISSONNET

soutenue le : **21 octobre 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Neurosciences

**Étude de deux lignées de souris
sélectionnées pour leur différence de
réponse à la méthionine sulfoximine**

THÈSE dirigée par :

Jean-François CLOIX Chargé de Recherche CNRS, Université d'Orléans
Ludovic LANDEMARRE Directeur de GLYcoDiag, Orléans

RAPPORTEURS :

Georges CHAPOUTHIER Directeur de Recherche CNRS, Hôpital Salpêtrière, Paris
Jacques LASCHET Chargé de Recherche INSERM, Hôpital Sainte Anne, Paris

JURY :

Jean-Luc DAVAL Directeur de Recherche INSERM, Nancy, Président du jury
Georges CHAPOUTHIER Directeur de Recherche CNRS, Paris, Rapporteur
Jacques LASCHET Chargé de Recherche INSERM, Paris, Rapporteur
Claire ELFAKIR Professeur d'Université, Orléans, Examinatrice
Jean-François CLOIX Chargé de Recherche CNRS, Orléans, Co-directeur de thèse
Ludovic LANDEMARRE Directeur de GLYcoDiag, Co-directeur de thèse



**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES
UNIVERSITÉ D'ORLÉANS**

**Étude de deux lignées de souris
sélectionnées pour leur différence de
réponse à la méthionine sulfoximine**

Thèse présentée par

Arnaud BOISSONNET

pour l'obtention du

Doctorat de l'Université d'Orléans

en NEUROSCIENCES

soutenue le 21 octobre 2011

Thèse dirigée par :

Jean-François CLOIX

Chargé de Recherche CNRS, Université d'Orléans

Ludovic LANDEMARRE

Directeur de GLYcoDiag, Orléans

COMPOSITION DU JURY :

Jean-Luc DAVAL

Directeur de Recherche INSERM, Nancy, Président du jury

Georges CHAPOUTHIER

Directeur de Recherche CNRS, Paris, Rapporteur

Jacques LASCHET

Chargé de Recherche INSERM, Paris, Rapporteur

Claire ELFAKIR

Professeure de l'Université d'Orléans, Examinatrice

Jean-François CLOIX

Chargé de Recherche CNRS, Orléans, Co-directeur de thèse

Ludovic LANDEMARRE

Directeur de GLYcoDiag, Orléans, Co-directeur de thèse

Laboratoires d'accueil :



Laboratoire de Neurobiologie

Université d'Orléans
Rue de Chartres
45067 ORLEANS CEDEX

GLYcoDiag

520 rue de Chanteloup
45520 CHEVILLY



AVANT-PROPOS

La reproduction de fragments de cet ouvrage (un ou deux paragraphes au maximum) et la reproduction de figures originales (une ou deux au maximum) sont autorisées si ces reproductions sont référencées (Boissonnet A., Étude de deux lignées de souris sélectionnées pour leur différence de réponse à la méthionine sulfoximine, thèse de l'Université d'Orléans, pages). Toutes demandes pour des reproductions plus importantes ou pour des informations complémentaires doivent être envoyées à boissonnetarnaud@yahoo.fr.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu les trois personnes qui m'ont permis d'effectuer cette thèse, le Pr Tobias Hévor, directeur du Laboratoire de Neurobiologie, le Dr Ludovic Landemarre, directeur de GLYcoDiag et le Dr Jean-François Cloix. Vous m'avez fourni le matériel, l'aide et les conseils dont j'avais besoin pour que cette thèse aboutisse et je vous en remercie encore une fois.

Les Dr Georges Chapoutier et Jacques Laschet ont acceptés d'être les rapporteurs de ce travail et je les en remercie. Merci également au Dr Jean-Luc Daval d'avoir accepté la présidence du jury et au Pr Claire Elfakir pour avoir jugé ce travail lors de la soutenance de thèse.

Je remercie le Conseil Général du Loiret pour avoir participé en grande partie au financement de la thèse.

Un grand merci à Philippe Moreau du Laboratoire de Neurobiologie. Son aide a été précieuse, tant à l'animalerie que dans la culture cellulaire. Je remercie également le Dr Éric Duverger pour ces conseils et Perrine Cancellieri de GLYcoDiag pour son aide technique. Enfin, comme l'aide parfois consiste à décompresser, merci à Évelyne et son bureau des plaintes.

Ces remerciements s'adressent aussi aux personnes qui, comme moi, ont été de passage dans le laboratoire. Il y a Yohann, Mélanie, Guilhem, Matthieu et Hélène qui ont déjà obtenu leurs thèses, Virginie et Anna qui sont quant à elle sur la bonne voie pour être Docteur, ainsi que Maria et tous les autres stagiaires qui ont apporté une pierre plus ou moins grande à l'édifice. Vous m'avez permis de passer d'agréables moments et de rire, et ce même en écrivant ces lignes (merci M.L.).

Je remercie ma famille pour leur soutien sans faille : mes parents, mon frère, mes oncles, mes cousines Angélique et Séverine, sans oublier Stéphane et Christophe. Merci également à mes amis, qu'ils soient de St Dyé, Blois, Tours ou Toulouse, ainsi qu'à la Green Team.

Pour finir, je remercie les chimistes toulousains et plus particulièrement le Dr Jean-Marc Escudier. Jean-Marc, tu as d'abord su me faire aimer le travail de recherche et tu m'as ensuite toujours encouragé et soutenu. Je n'oublie pas que si toutes ces pages ont été écrites, c'est également grâce à toi.

Ah non... Il me reste encore à remercier les souris qui, après un long moment d'hésitation, ont enfin décidé de faire des petits. Merci donc à Lucie, Raoul, Paulette, Clara et toutes les autres...

SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES RÉACTIFS	11
LISTE DES TRAVAUX	12
PRÉSENTATION DU TRAVAIL	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE	14
I - Présentation de l'épilepsie	15
I.A - Épidémiologie	15
I.B - Les causes de l'épilepsie	15
I.B.1 - <i>L'origine symptomatique</i>	15
I.B.2 - <i>L'origine idiopathique</i>	15
I.B.3 - <i>Implication des anomalies génétiques</i>	15
I.C - Localisation du foyer épileptogène	17
I.C.1 - <i>L'électroencéphalogramme (EEG)</i>	17
I.C.2 - <i>La tomographie à émission de positons (PET)</i>	17
I.C.3 - <i>La tomographie à émission monophotonique (MET)</i>	18
I.C.4 - <i>La résonance magnétique (MR)</i>	18
I.C.5 - <i>Utilisation des différentes techniques dans le diagnostic</i>	19
I.D - Traitements médicamenteux	19
II - Présentation des différents types de modèle animal	20
II.A - Avantage des modèles animaux	20
II.B - Les modèles génétiques	20
II.B.1 - <i>Les modèles obtenus par sélection</i>	20
II.B.2 - <i>Les modèles obtenus par génie génétique</i>	21
II.C - Les modèles induits	21
II.C.1 - <i>Les modèles induits par une stimulation physique</i>	21
II.C.2 - <i>Les modèles induits par une stimulation chimique</i>	21
II.D - Les modèles induits dépendant du fond génétique	22
II.D.1 - <i>Présentation du type de modèle</i>	22
II.D.2 - <i>Modèle sans sélection spécifique</i>	22
II.D.3 - <i>Modèle avec sélection spécifique</i>	23
II.E - Modèle pour l'étude de l'épilepsie et du métabolisme glucidique	23
III - Présentation de la méthionine sulfoximine (MSO)	24
III.A - Caractéristiques de la molécule	24
III.B - Les cibles de la MSO	25
IV - Sélection d'un modèle murin pour l'étude de l'effet de la MSO	25
IV.A - Le brassage génétique	26
IV.B - La sélection par la MSO	27
IV.C - L'obtention de lignées consanguines	28
PREMIÈRE PARTIE : Comparaison <i>in vivo</i> des lignées MSO-Slow et MSO-Fast	29
Introduction	30
I - Les voies glutamatergique et GABAergique dans les neuropathologies	30

II - La voie de signalisation glutamatergique	31
II.A - Le neurone pré-synaptique	31
II.B - Les récepteurs post-synaptiques	31
II.B.1 - Les récepteurs glutamatergiques ionotropes	31
II.B.1.a - Les récepteurs de type NMDA.....	33
II.B.1.b - Les récepteurs de type AMPA.....	34
II.B.1.c - Les récepteurs de type kaïnate	34
II.B.2 - Les récepteurs glutamatergiques métabotropes	34
II.C - Activation des récepteurs glutamatergiques post-synaptiques	35
II.D - Arrêt de la transmission du signal	36
III - La voie de signalisation GABAergique.....	37
III.A - Les récepteurs GABAergiques ionotropes.....	38
III.B - Les récepteurs GABAergiques métabotropes	39
IV - Les récepteurs pré-synaptiques.....	40
V - Action <i>in vivo</i> de convulsivants et d'anticonvulsivants.....	41
V.A - Mécanismes d'action.....	41
V.B - Largeur de spectre d'action	41
V.C - Présentation des molécules testées	41
V.C.1 - L'acide kaïnique (KA).....	42
V.C.2 - Le MK-801	42
V.C.3 - Le pentylènetétrazole (PTZ).....	42
V.C.4 - L'acide valproïque (VPA)	43
V.C.5 - La pilocarpine (PC)	43
VI - Implication de la neurotransmission dans les fonctionnalités cérébrales	43
VI.A - L'étude comportementale	43
VI.B - Les principales fonctionnalités.....	44
VI.C - Les tests utilisés	44
Matériel et méthodes.....	47
I - Les réactifs	47
II - Les animaux.....	47
III - Étude de la latence à différents convulsivants et anti-convulsivants.....	47
III.A - Préparation de la MSO	47
III.B - Préparation des convulsivants et anti-convulsivants.....	48
III.C - Injection.....	48
III.D - Détermination des temps de latence de convulsions.....	48
III.D.1 - L'échelle de Racine	48
III.D.2 - Observation des convulsions.....	49
IV - Étude des crises par électroencéphalogramme (EEG).....	50
V - L'étude comportementale.....	50
V.A - L'anxiété	50
V.B - L'apprentissage	51
VI - Traitement des résultats.....	52
Résultats et discussion	53
I - Réponse à la MSO	53
I.A - Effet-doses de la MSO.....	53
I.B - Etude de la mortalité et de la cécité chez les MSO-Slow	54
I.C - Latence d'apparition des différents stades de convulsion.....	55
I.D - Activité électroencéphalique	56
I.E - Conclusion des études après injection de MSO	58
II - Effets de convulsivants et d'anticonvulsivants	58
II.A - Étude de trois convulsivants	58
II.B - Action de deux anticonvulsivants.....	61
II.C - Le MK-801 comme convulsivant	63

III - Etude comportementale	64
III.A - L'anxiété	64
III.B - L'apprentissage	65
III.C - Les voies de signalisations mises en évidence	67
IV - Mise en évidence de la voie glutamatergique par l'étude <i>in vivo</i>	68
DEUXIÈME PARTIE : Étude des métabolismes glutamatergique et glucidique chez les lignées MSO-Slow et les MSO-Fast	69
Introduction	70
I - Organisation tissulaire du cerveau	70
II - Organisation cellulaire du cerveau	71
II.A - Les neurones.....	71
II.B - La glie	72
II.B.1 - Les microgliocytes	73
II.B.2 - Les oligodendrocytes	73
II.B.3 - Les épendymocytes.....	73
II.B.4 - Les astrocytes.....	73
II.B.4.a - Caractéristiques générales des astrocytes.....	73
II.B.4.b - Principales fonctions astrocytaires.....	74
II.B.4.c - La culture <i>in vitro</i> d'astrocytes	75
II.B.5 - Les synantocytes	75
II.B.6 - Les cellules gliales cérébrales non ubiquitaires.....	75
III - Le métabolisme glutamatergique	75
III.A - Transformation en GABA.....	75
III.B - La glutamine comme intermédiaire.....	76
III.B.1 - La glutamine dans le cycle glutamate-glutamine.....	76
III.B.2 - Les transporteurs de glutamine et d'ammoniaque	78
III.C - Le cycle de Krebs	79
IV - Le métabolisme glucidique	80
IV.A - Entrée du glucose dans l'astrocyte.....	80
IV.B - Les principales voies utilisant le glucose	80
IV.B.1 - La glycolyse et gluconéogenèse.....	80
IV.B.2 - La glycogénèse.....	81
IV.B.2.a - Structure du glycogène	81
IV.B.2.b - Synthèse et dégradation du glycogène	82
IV.B.2.c - Régulation de la glycogénèse et de la glycogénolyse.....	83
IV.B.3 - La voie des pentoses-phosphate.....	84
V - La glycosylation	85
V.A - La glycosylation chez les mammifères	85
V.B - Les glycoprotéines.....	87
V.B.1 - Les O-glycannes.....	87
V.B.2- Les N-glycannes	88
V.B.3 - Principales fonctions des O- et N-glycannes	89
V.C - La glycosylation de surface	89
V.C.1 - Les glycolipides.....	89
V.C.2 - Rôle de la glycosylation de surface	91
V.D - Les principales techniques d'analyse des glycannes.....	91
V.E - L'utilisation de lectines pour l'analyse des glycannes	92
V.E.1 - Présentation des lectines.....	92
V.E.2 - Propriétés des lectines	93
V.E.3 - Les lectines comme outils d'analyse des glycannes.....	94
V.E.3.a - La chromatographie d'affinité	94
V.E.3.b - Le marquage par les lectines.....	94
V.E.3.c - Les puces à lectines.....	95

V.E.3.d - La technique GLYcoDiag.....	96
V.F - Objectifs de l'étude de la glycosylation	96
Matériel et méthodes.....	97
I - Les réactifs	97
II - Les animaux.....	97
III - Injections de la méthionine sulfoximine.....	97
IV - Sacrifice des animaux et récupération du cortex.....	98
V - Culture d'astrocytes.....	98
V.A - Mise en culture	98
V.B - Ajout de la MSO sur les cultures astrocytaires pour doser le glycogène	99
V.C - Cultures astrocytaires pour l'étude de la glycosylation de surface	99
VI - Dosage du glycogène.....	100
VI.A - Principe	100
VI.B - Récolte des cellules pour le dosage du glycogène	101
VI.C - Homogénéisation du tissu cérébral.....	101
VI.D - Méthodologie du dosage.....	101
VII - Étude l'activité de la glutamine synthétase (GS)	102
VIII - Étude des glycanes.....	103
VIII.A - Les glycoprotéines	103
<i>VIII.A.1 - Extraction et marquage des échantillons protéiques à la biotine.....</i>	<i>103</i>
<i>VIII.A.2 - Glycoprofil protéique.....</i>	<i>104</i>
VIII.B - La glycosylation de surface des astrocytes.....	105
IX - Dosage protéique selon la méthode de Bradford	105
X - Traitement des résultats	106
Résultats et discussion	107
I - Variation du glycogène cérébral	107
I.A - Le glycogène tissulaire	107
<i>I.A.1 - Étude des différences entre les mâles et les femelles</i>	<i>107</i>
<i>I.A.2 - Comparaison des souris des lignées consanguines à celles des lignées en cours de sélection.....</i>	<i>108</i>
<i>I.A.3 - Comparaison des lignées consanguines entre elles</i>	<i>111</i>
I.B - Le glycogène astrocytaire in vitro.....	112
I.C - Effet de la MSO sur la quantité de glycogène	113
II - L'activité de la glutamine synthétase (GS)	114
II.A - Étude de l'activité de la GS avec du glutamate.....	114
II.B - Étude de l'inhibition de la GS par la MSO.....	115
III - Étude de la glycosylation	116
III.A - Les glycoprotéines	116
<i>III.A.1 - Profil général et méthode de traitement des résultats.....</i>	<i>116</i>
<i>III.A.2 - Comparaisons des profils de glycosylation après injection de sérum physiologique</i>	<i>119</i>
<i>III.A.3 - Effet de la MSO sur la glycosylation des protéines.....</i>	<i>121</i>
III.A.3.a - Effet de la MSO par rapport au sérum physiologique	121
III.A.3.b - Comparaison des lignées entre elles.....	123
III.B - La glycosylation de surface.....	127
IV - Différences métaboliques mises en évidence	128
TROISIÈME PARTIE : Étude de la neurotransmission	
catécholaminergique et indolaminergique	130
Introduction.....	131
I - Les neurotransmetteurs monoaminés	131
I.A - La dopamine	131
<i>I.A.1 - Localisation cérébrale des neurones dopaminergiques.....</i>	<i>131</i>

I.A.2 - Les récepteurs dopaminergiques.....	132
I.A.3 - Les fonctions des voies dopaminergiques	132
I.B - L'adrénaline et la noradrénaline	133
I.B.1 - Localisation cérébrale des neurones adrénergiques et noradrénergiques.	133
I.B.2 - Les récepteurs adrénergiques	134
I.B.3 - Les fonctions des voies adrénergiques et noradrénergiques	134
I.C - La sérotonine.....	135
I.C.1 - Localisation cérébrale des neurones sérotoninergiques	135
I.C.2 - Les récepteurs sérotoninergiques	136
I.C.3 - Les fonctions des voies sérotoninergiques	136
II - Les voies métaboliques des monoamines	138
II.A - La voie métabolique des catécholamines	138
II.B - La voie métabolique des indolamines	140
III - L'analyse des neurotransmetteurs monoaminés	141
III.A - Les principales méthodes d'analyse des monoamines.....	141
III.B - La chromatographie liquide (LC).....	142
III.B.1 - Les modes de séparation en LC.....	142
III.B.2 - Les modes de détection en LC	143
Matériels et méthodes	144
I - Les réactifs	144
II - Les animaux.....	144
III - Injections de la méthionine sulfoximine.....	144
IV - Sacrifice des animaux et récupération du cortex.....	145
V - Extraction tissulaire.....	145
VI - L'analyse par HPLC-ECD.....	146
VI.A - L'appareillage.....	146
VI.B - Les méthodes utilisées	146
VI.B.1 - La méthode de Mefford.....	146
VI.B.2 - L'analyse des composés avec une seule injection.....	147
VII - Acquisition des données et traitement des résultats	148
Résultats et discussion	149
I - Les neurotransmetteurs monoaminés pour les souris G6	149
II - Étude des monoamines sur les lignées consanguines.....	152
II.A - La voie dopaminergique	152
II.B - Les voies adrénergique et noradrénergique	154
II.C - La voie sérotoninergique	156
III.D - Les acides aminés précurseurs	158
III - Différences dans les voies de neurotransmission monoaminergiques	159
DISCUSSION GÉNÉRALE	161
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	167
BIBLIOGRAPHIE	168

ABRÉVIATIONS

5-HIAA : Acide 5-hydroxy-indolacétique
5-HT : 5-hydroxy-tryptamine, sérotonine
5-HTP : 5-hydroxy-tryptophane
A : Adrénaline
ADH : Alcool déshydrogénase
ALDH : Aldéhyde déshydrogénase
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalolepropionate
BSA : Albumine de sérum bovin
COMT : Catéchol O-méthyl transférase
DA : Dopamine
DMEM(+) : Milieu Eagle modifié par Dubelcco (complété)
DOPAC : Acide dihydroxy-phénylacétique
ED₅₀ : Dose pour laquelle 50% des souris convulsent
EEG : Électroencéphalogramme
FBPase : Fructose-1,6-bisphosphatase
Fuc : L-fucose
GABA : Acide γ -amino-butérique
Gal : D-galactose
GalNAc : N-acétyl-D-galactosamine
GFAP : protéine acide fibrillaire gliale
Glc : D-glucose
GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine
GLUT : Transporteur uniport de glucose
GS : Glutamine synthétase
HPLC : Chromatographie liquide à haute pression
HVA : Acide homovanillique
KA : Acide kaïnique
KO : Knock-out
MA : Métadrénaline
Man : D-mannose
MAO : Monoamine oxydase
MHPG : 3-méthoxy-4-hydroxy-phényléthylèneglycol
MSO : L-méthionine-*R,S*-sulfoximine
NA : Noradrénaline
Neu5Ac : Acide N-acétyl-D-neuraminique
Neu5Gc : Acide N-glycolyl-D-neuraminique
NMA : Normétadrénaline
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
PBS(+) : Tampon phosphate salin (complet)
PC : Pilocarpine
Phe : Phénylalanine
PTZ : Pentylènetétrazole
RM(N) : Résonance magnétique (nucléaire)
SEM : Écart standard à la moyenne
SGLT : Transporteur de glucose sodium-dépendant
TEM : Tomographie à émission monophotonique
TEP : Tomographie à émission de positons
Trp : Tryptophane
Tyr : Tyrosine
VPA : Acide valproïque

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Électroencéphalogramme d'hippocampe humain	17
Figure 2 : Tomographie à émission de positons avec du ¹⁸ F-fluorodéoxyglucose	18
Figure 3 : Formules chimiques de la méthionine sulfoximine et de la méthionine	24
Figure 4 : Corrélacion entre la latence et le taux de glycogène après injection de MSO	26
Figure 5 : Croisements entre les huit lignées parentales	26
Figure 6 : Sélection des lignées par la MSO sur dix générations.....	27
Figure 7 : Schéma de la balance des voies glutamatergique et GABAergique dans des troubles comportementaux	30
Figure 8 : Les sous-unités de récepteurs glutamatergiques ionotropes humains	32
Figure 9 : Schéma d'un récepteur glutamatergique ionotrope.	33
Figure 10 : Fonctionnement des récepteurs métabotropes.	36
Figure 11 : Schéma d'un récepteur GABA _A	39
Figure 12 : Formules chimiques des convulsivants et des anticonvulsivants utilisés	42
Figure 13 : Présentation des différents tests d'anxiété en fonction du type de réponse.....	45
Figure 14 : Présentation des principaux appareillages permettant l'étude de l'apprentissage	46
Figure 15 : Appareillages utilisés pour l'étude comportementale, l'open field et le labyrinthe radiaire.....	46
Figure 16 : Effet-doses de la MSO pour les lignées MSO-Slow et MSO-Fast consanguines	53
Figure 17 : Taux de convulsion pour les souris MSO-Slow et MSO-Fast en fonction de la dose de MSO injectée.....	54
Figure 18 : Taux de mortalité et de cécité chez les souris MSO-Slow consanguines.....	55
Figure 19 : Temps de latence pour l'apparition des différents stades de convulsion	56
Figure 20 : EEG chez les MSO-Fast et les MSO-Slow après injection de MSO.....	57
Figure 21 : Effet de 3 convulsivants.	59
Figure 22 : Latence au KA.	60
Figure 23 : Temps de latence à la MSO après injection d'anticonvulsivants	61
Figure 24 : État des souris 10 heures après l'injection de la MSO	62
Figure 25 : Effet convulsivant du MK-801	63
Figure 26 : Résultats pour les différents aspects de l'open field.....	64
Figure 27 : Évolution de l'apprentissage des souris pour les jours J3 à J5.....	66
Figure 28 : Schéma général d'un cerveau humain.	70
Figure 29 : Schéma des différentes cellules cérébrales.....	71
Figure 30 : Présentation des types de neurones les plus répandus chez l'homme.	72
Figure 32 : Réaction catalysée par la glutamine synthétase.....	76
Figure 31 : Schéma du cycle de la glutamine pour le recyclage du glutamate	77
Figure 33 : Recyclage du glutamate issu de la neurotransmission par le cycle de Krebs.....	79
Figure 34 : Glycolyse et gluconéogenèse.....	81
Figure 35 : Glycogénèse et glycogénolyse.....	82
Figure 36 : Mécanismes cérébraux de régulation de la glycogénèse et de la glycogénolyse .	83
Figure 37 : Voie des pentoses phosphate	84
Figure 38 : Monosaccharides les plus représentés chez les mammifères	85
Figure 39 : Nomenclature d'un oligosaccharide, l'antigène LewisX sialylé	86
Figure 40 : Les 8 motifs des O-glycannes commençant par un GalNAc.....	87
Figure 41 : Maturation des N-glycoprotéines	88
Figure 42 : Exemples de formes de N-glycannes.....	89
Figure 43 : Biosynthèse des glycosphingolipides	90
Figure 44 : Profil glycannique de deux lignées cellulaires par puce à lectines.....	95

Figure 45 : Réactions enzymatiques dans le dosage du glycogène.....	100
Figure 46 : Marquage des protéines par la LC-Biotine.....	104
Figure 47 : Effet de la MSO sur le taux de glycogène en fonction du sexe.....	107
Figure 48 : Taux de glycogène chez les souris C6 et G6 après injection de sérum physiologique	109
Figure 49 : Variation du taux de glycogène chez les souris C6 et G6 après injection de MSO	110
Figure 50 : Variation du taux de glycogène pour les souris MSO-Fast et MSO-Slow.....	111
Figure 51 : Variation du taux de glycogène à 4, 8 et 24 heures après injection de MSO	112
Figure 52 : Effet de la MSO sur le glycogène astrocytaire	113
Figure 53 : Activité de la glutamine synthétase corticale	114
Figure 54 : Constantes cinétiques pour la glutamine synthétase avec le glutamate.....	115
Figure 55 : Inhibition de la glutamine synthétase corticale par la MSO.....	116
Figure 56 : Profils de glycosylation des protéines du cortex cérébral des souris MSO-Fast	117
Figure 57 : Schéma du traitement des résultats pour les glycoprotéines	118
Figure 58 : Schéma représentant la proportionnalité entre les intensités sur certaines lectines des MSO-Fast et MSO-Slow.....	121
Figure 59 : Schéma de l'effet de la MSO sur l'intensité des signaux de CF-1, M-1, CX-2 et GAN-1	125
Figure 60 : Schéma des différences dans les glycoprofiles	126
Figure 61 : Glycoprofil d'astrocytes MSO-Slow et MSO-Fast	127
Figure 62 : Glycoprofiles d'astrocytes avec ou sans MSO 10mM.....	128
Figure 63 : Projections neuronales dopaminergiques dans le cerveau humain.....	131
Figure 64 : Projections neuronales adrénérergiques et noradrénérergiques dans le cerveau humain	133
Figure 65 : Projections neuronales sérotoninergiques dans le cerveau humain.....	135
Figure 66 : Biosynthèse des neurotransmetteurs catécholaminergiques avec leurs abréviations	138
Figure 67 : Catabolisme de la dopamine et abréviations des produits de dégradation	139
Figure 68 : Catabolisme de la noradrénaline et de l'adrénaline et abréviations des produits de dégradation	139
Figure 69 : Métabolisme de la sérotonine et abréviations des produits de dégradation	140
Figure 70 : Débits utilisés pour la séparation par HPLC	148
Figure 71 : Variation des quantités d'indolamines pour les souris G6	150
Figure 72 : Variation des quantités de catécholamines pour les souris G6.....	151
Figure 73 : Composés de la voie dopaminergique chez les lignées consanguines	153
Figure 74 : Composés de la voie adrénérergique chez les lignées consanguines	154
Figure 75 : Composés de la voie noradrénérergique chez les lignées consanguines	155
Figure 76 : Composés de la voie sérotoninergique chez les lignées consanguines	157
Figure 77 : Acides aminés précurseurs chez les lignées consanguines.....	158
Figure 78 : Différences entre les lignées impliquées dans la réponse à la MSO	167

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Gènes connus codant pour des canaux ioniques ou des récepteurs ioniques.....	16
Tableau 2 : Techniques de résonance magnétique (MR) utilisées dans le diagnostic de l'épilepsie	19
Tableau 3 : Transporteurs utilisés pour la régulation corticale intercellulaire de glutamine..	78
Tableau 4 : Premiers monosaccharides constituant les différents O-glycannes présents chez les mammifères	87
Tableau 5 : Gamme de concentrations de glucose.....	102
Tableau 6 : Nom des lectines utilisées et structures reconnues	117
Tableau 7 : MSO-Fast après injection de sérum physiologique	119
Tableau 8 : MSO-Slow après injection de sérum physiologique.....	120
Tableau 9 : Mâles après injection de sérum physiologique	120
Tableau 10 : Femelles après injection de sérum physiologique	120
Tableau 11 : MSO-Fast après injection de MSO à 75mg/kg	121
Tableau 12 : Effet d'une dose convulsivante de MSO ; Femelles MSO-Fast	122
Tableau 13 : Effet d'une dose convulsivante de MSO ; Mâles MSO-Fast.....	122
Tableau 14 : Effet d'une dose non convulsivante de MSO ; Femelles MSO-Slow.....	122
Tableau 15 : Effet d'une dose non convulsivante de MSO ; Mâles MSO-Slow	122
Tableau 16 : Effet d'une dose convulsivante de MSO ; Femelles MSO-Slow.....	123
Tableau 17 : Effet d'une dose convulsivante de MSO ; Mâles MSO-Slow	123
Tableau 18 : MSO-Slow après injection de MSO à 75mg/kg	123
Tableau 19 : MSO-Slow après injection de MSO à 200mg/kg	123
Tableau 20 : Femelles après injection de MSO à une dose convulsivante	124
Tableau 21 : Mâles après injection de MSO à une dose convulsivante.....	124
Tableau 22 : Femelles après injection de MSO à 75mg/kg	124
Tableau 23 : Mâles après injection de MSO à 75mg/kg.....	124
Tableau 24 : Femelles MSO-Slow après injection de MSO	124
Tableau 25 : Mâles MSO-Slow après injection de MSO.....	124
Tableau 26 : Préférence des différents récepteurs adrénergiques et protéines G associées..	134
Tableau 27 : Récepteurs métabotropes sérotoninergiques.....	136
Tableau 28 : Principales fonctions des récepteurs sérotoninergiques.....	137
Tableau 29 : Réalisation de la gamme étalon pour la méthode de Mefford	147
Tableau 30 : Composés analysés avec leurs concentrations finales dans le standard	147

LISTE DES RÉACTIFS

Produit	Fournisseur	Référence	Lot
Acétate de sodium	Sigma	S2889-5KG	066K0043
Acide acétique	Fluka	45740-1L-F	BCBC1976
Acide citrique monohydraté	Sigma	C1909-1KG	058K0033
Acide homovanillique	Sigma	H1252-100MG	014K5005
Acide kainique	Sigma	K0250-10MG	118K1414
Acide perchlorique 70%	Fischer Scientific	P/1280/PB08	080 2459
Acide trichloroacétique	Sigma	T8657-250G	059K0017
Acide valproïque	Sigma	P4543-10G	067K0761
Adénosine triphosphate disodique	Sigma	A2383-25G	049K7006
Adrénaline	Sigma	E4250	61H0493
Albumine de sérum bovin	Sigma	A7030-10G	025K0598
α -Amyloglucosidase	Fluka	10115	1118068 54304195
Biotine activée (Ez-Link Sulfo-NHS-Biotin)	Pierce	0021217	96110769 LA141957
CFSE (N-succinimidyl-carboxyfluorescéine diacétylée)	Sigma	21888	0001433874
Chlorure de calcium anhydre	Sigma	C4901	62H0245
Chlorure de magnésium anhydre	Sigma	M8266-100G	108K0068
Chlorure de potassium	Sigma	P4504	121K0145
Chlorure de sodium	Sigma	S9888-2,5KG	058K0075
Cystéine	Sigma	C1276	39F0956
o-Dianisidine	Sigma	D3252	95H5016
Dichlorure d'o-phénylènediamine	Sigma	P1526	035K5319
DOPAC	Sigma	D9128	20H2607
Dopamine	Sigma	H8502	21H3673
DMEM (Milieu Eagle modifiée par Dubelcco)	Sigma	D5546	RNBB1930
EDTA	Sigma	ED2SS	100K0283
D-Glucose	Sigma	G5767-500G	125K0200
Glucose oxydase d'aspergillus	Fluka	49180	1109292 14804143
L-Glutamate	Sigma	G1626	084K0068
L-Glutamine (solution 200mM)	Biowest	X0550-100	S07914X0550
Glycogène	Sigma	G0885-5G	065K7009
5-HIAA	Sigma	H8876	12H0552
Hydroxylamine	Sigma	H2391	69H3455
5-Hydroxytryptophane	Sigma	H9772-250MG	045K2512
Imidazole	Sigma	I0125	042K0031
Inhibiteur de protéases (métalloprotéases, protéases à sérine, à cystéine et à aspartate)	Sigma	P2714-1BTL	037K4012
β -Mercaptoéthanol	Sigma	M3148	102K0025
Métadrénaline	Sigma	M8625-100MG	094K3730
Méthanol HPLC grade	Fischer Scientific	M/4056/17	0963887
Méthionine sulfoximine	Sigma	M5379-5G	038K1131
MHPG	Sigma	H1377	AR014800/1
MK-801	Sigma	M107-5G	078K4606
Noradrénaline	Sigma	A7257	111H7759
Normétadrénaline	Sigma	A9512-250MG	024K1048
Octylsulfate de sodium	Sigma	O4003-5G	030M5218V
Pénicilline (10000U/ml)/Streptomycine (10mg/ml), solution 100X	Biowest	L0022-100	S07497L0022
Pentylènetétrazole	Sigma	P6500-25G	097K0663
Peroxyde d'hydrogène	Sigma	H1009	075K3757
Peroxydase	Sigma	P6782-100MG	118K76701
Phosphate de sodium dibasique	Sigma	S0876-1KG	077K0128
Phosphate de sodium monobasique	Sigma	S0751-500G	016K0039
Pilocarpine	Sigma	P6503-5G	104K12231
Réactif de dosage protéique par la méthode de Bradford	Bio-Rad	600-0005	018985
Sérotinine	Sigma	H7752	121H0385
Sérum de veau fœtal	Biowest	S1810-500	S04968S1810
Trichlorure de fer	Sigma	F7134	20K3681
Triton X100	Sigma	X100	122H0766
Tryptophane	Sigma	T0254	19F0716
Tyrosine	Fluka	93830	1220574 54505131

LISTE DES TRAVAUX

Les résultats obtenus ont l'objet de communications écrites ou orale :

Communications écrites

- Cloix J.F., Tahiri Z., **Boissonnet A.** et Hévor T. (2010). Brain glycogen and neurotransmitter levels in fast and slow methionine sulfoximine-selected mice. *Exp. Neurol.* **225**, 274-83.
- **Boissonnet A.**, Hévor T. et Cloix J.F. (2011). Brain glycogen and methionine sulfoximine-dependent epilepsy. *Epilepsy / Book 6 (Ed. InTech)*. sous presse, ISBN 978-953-307-1418-3.
- **Boissonnet A.**, Hévor T. et Cloix J.F. (2011). Phenotypic differences between Fast and Slow methionine sulfoximine-inbred mice: seizures, anxiety, and glutamine synthetase. *Epilepsy Res.* sous presse.

Communication orale

- Analyse glycomique cérébrale chez un modèle murin d'épilepsie. *Colloque de la Société de Circulation et Métabolisme du Cerveau*. 29 janvier 2010.

Des communications scientifiques supplémentaires ont été réalisées :

- Dupouy C., Millard P., **Boissonnet A.** et Escudier J.M. (2010). α,β -D-CNA preorganization of unpaired loop moiety stabilizes DNA hairpin. *Chem Commun (Camb)*. **46**, 5142-4.
- **Boissonnet A.**, Dupouy C., Millard P., Durrieu M.P., Tarrat N. et Escudier J.M. (2011). α,β -D-CNA featuring canonical and noncanonical α/β torsional angles behaviours within oligonucleotides. *New J Chem*. **35**, 1528-33.

PRÉSENTATION DU TRAVAIL

Le cerveau est un des organes les plus complexes du corps humains. Une part importante des maladies le touchant a une origine ou des mécanismes qui commencent seulement à être compris. Plusieurs de ces anomalies peuvent conduire à la même maladie, comme c'est le cas pour l'épilepsie. Cette neuropathologie possède plusieurs formes, dont certaines ont un mécanisme encore inconnu.

L'utilisation d'un modèle d'induction de crises épileptiformes par un agent chimique, la méthionine sulfoximine (MSO), permet de mimer la forme la plus grave d'épilepsie humaine chez des animaux. Le développement par le laboratoire de Neurobiologie de l'Université d'Orléans d'un modèle murin, composé des lignées de souris MSO-Slow et MSO-Fast ayant toutes les deux des réponses extrêmes à la MSO, a pour but de mieux comprendre la relation existant entre l'apparition de convulsions généralisées et les voies glutamatergique et glucidique. Cette étude s'organise en trois parties répondant chacune à une problématique différente.

1^{ère} partie

Confirmation d'une différence dans la voie de neurotransmission glutamatergique entre les lignées MSO-Slow et MSO-Fast consanguines par injection de convulsivants et d'anticonvulsivants, y compris la MSO, et étude comportementale.

2^{ème} partie

Différence dans les voies métaboliques glucidique et glutamatergique des deux lignées, en basal et après injection de MSO, par l'étude du taux de glycogène, de l'activité de la glutamine synthétase et d'une modification post-traductionnelle, la glycosylation.

3^{ème} partie

Rôle des neurotransmetteurs monoaminés dans les crises épileptiques par mesure de treize composés de la famille des catécholamines et de la famille des indolamines.

Une discussion générale permettra enfin de relier les résultats des différentes parties entre eux et d'établir différentes hypothèses dans l'apparition des convulsions généralisées.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I - Présentation de l'épilepsie

I.A - Épidémiologie

L'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'environ un pourcent de la population mondiale souffre d'une des 40 formes d'épilepsie recensées par cette organisation. Les patients se divisent en deux groupes selon l'origine symptomatique ou idiopathique des crises. L'efficacité des médicaments est observée pour 70% des adultes et des enfants atteints, c'est-à-dire que les crises disparaissent complètement pendant le traitement. Pour ces patients, la suppression des médicaments au bout de deux à cinq ans de traitement réussi est envisagée et conduit à une guérison de 70% des enfants et de 60% des adultes sans risque de rechute. Vingt-cinq à 30% des épileptiques sont actuellement pharmacorésistants et seule la chirurgie peut être efficace, lorsque celle-ci est possible.

Cette maladie est souvent associée à d'autres neuropathologies plus ou moins importantes, comme les syndromes de l'X fragile ou de Dravet. Les patients atteints du syndrome d'Angelman sont par ailleurs 85% à être atteints de crises épileptiques. Malgré l'association des crises à une maladie précise, il existe plusieurs traitements de celles-ci qui diffèrent en fonction du patient (Fiumara *et al.*, 2010).

I.B - Les causes de l'épilepsie

I.B.1 - L'origine symptomatique

Des crises peuvent apparaître lorsque l'intégrité physique du cerveau a été endommagée. Une lésion structurelle du système nerveux, telle que les conséquences d'une tumeur, d'un traumatisme crânien ou d'une opération, peut en être la cause. L'apoptose des cellules, notamment provoqué par un manque d'oxygène lors d'un accident vasculaire cérébral, peut entraîner les mêmes conséquences.

I.B.2 - L'origine idiopathique

Les crises relèvent de troubles fonctionnels ou d'une prédisposition héréditaire. Dans le premier cas, des stimulations physiques intempestives peuvent conduire à l'apparition de crises épileptiques. Les plus communes sont les stimulations visuelles, que ce soit en regardant un écran et plus particulièrement en utilisant des jeux vidéos ou par exposition à des stroboscopes. Certains patients peuvent également avoir des crises déclenchées par des bruits spécifiques. Dans le cas d'une prédisposition héréditaire, aucune stimulation n'est nécessaire à l'apparition des crises et seuls un ou plusieurs gènes déficients sont à mettre en cause. Un grand nombre d'anomalie de gènes ont déjà été impliquées dans l'épilepsie, expliquant en partie la multiplicité des formes de cette maladie. Les patients pharmacorésistants sont en grande majorité atteints de formes d'épilepsie d'origine idiopathique et génétique.

I.B.3 - Implication des anomalies génétiques

Les anomalies génétiques sont suspectées dans la plupart des cas d'épilepsies idiopathiques mais seules les origines de quelques formes rares d'épilepsies ont été élucidées (Greenberg et Subaran, 2011). Aucune relation n'a pu être formellement établie entre ces

formes rares d'épilepsies et d'autres formes plus courantes. La plupart de ces gènes directement impliqués codent pour des canaux ioniques ou des récepteurs ioniques (tableau 1).

Tableau 1 : Gènes connus codant pour des canaux ioniques ou des récepteurs ioniques impliqués dans l'épilepsie et formes d'épilepsie associées à ces gènes (Rees, 2010 ; Tripathi *et al.*, 2008).

Famille de protéines	Gène identifié	Forme d'épilepsie
Canaux calciques	CACNA1A	Ataxie épisodique de type 2 Ataxie cérébro-spinale de type 6 Épilepsie généralisée idiopathique Épilepsie associée à la migraine hémiplégique familiale de type 1
	CACNA1H	Épilepsie/absence infantile
	CACNB4	Épilepsie généralisée idiopathique Épilepsie myoclonique juvénile
Canaux chlorures	CLCN2	Épilepsie/absence infantile Épilepsie de type Grand Mal au réveil
Canaux potassiques	KCNQ2	Épilepsie néonatale bénigne de type 1
	KCNQ3	Épilepsie néonatale bénigne de type 2
	LGI1	Épilepsie partielle autosomale dominante avec des accompagnements auditifs
Canaux sodiques	SCN1A	Épilepsie généralisée avec des crises fébriles (plus) Épilepsie myoclonique sévère de l'enfant
	SCN1B	Épilepsie généralisée avec des crises fébriles (plus)
	SCN2A	Crises néonatales et infantiles familiales bénignes
Récepteurs GABA _A	GABRA1	Épilepsie myoclonique juvénile
	GABRD	Épilepsie généralisée avec des crises fébriles (plus)
	GABRG2	Épilepsie/absence infantile Épilepsie généralisée avec des crises fébriles (plus)
Récepteurs nicotiques	CHRNA4	Épilepsie nocturne du lobe frontal autosomale dominante de type 1
	CHRN2	Épilepsie nocturne du lobe frontal autosomale dominante de type 3

D'autres gènes, ne codant pas pour des canaux, peuvent également être à l'origine de certaines formes d'épilepsie. Les gènes impliqués dans les formes d'épilepsie myoclonique progressive ont été parmi les premiers à être mis en évidence. Une mutation dans le gène codant pour la cystatine B, un inhibiteur de protéases à cystéine, a été impliquée dans l'épilepsie myoclonique progressive de type 1 (Lehtinen *et al.*, 2009). Les deux autres gènes, EMP2A et NHLRC1, codent respectivement pour la laforine et une protéine-ubiquitine ligase ubiquitylant la laforine. Ces deux protéines participent au contrôle du taux de glycogène et une déficience de leurs gènes conduit à la maladie de Lafora, dont les patients présentent des corps d'inclusion cérébraux de glycogène. Un des symptômes de cette maladie est la forme d'épilepsie myoclonique progressive de type 2 (Singh et Ganesh, 2009).

La recherche du type d'épilepsie ne peut donc pas, dans ces formes d'origine génétique, être facilement réalisée par analyse du génotype du patient. Le diagnostic doit être fait à partir des autres symptômes du patient, comme la schizophrénie ou le retard mental, ou

par localisation du foyer épileptogène, comme c'est le cas pour les formes d'épilepsie d'origine symptomatique.

I.C - Localisation du foyer épileptogène

Les différentes formes de manifestation d'épilepsie sont classées en deux groupes majeurs : les crises épileptiques partielles et les crises épileptiques généralisées. L'apparition de crises épileptiques généralisées se caractérise par des décharges neuronales de façon symétrique et immédiate dans les deux hémisphères de l'encéphale alors que les formes partielles ne concernent qu'une zone plus limitée de structures corticales et/ou sous corticales appelée foyer épileptogène. Chacune de ses formes se manifeste par une activité des neurones temporairement excessive et synchrone qui est notamment utilisée pour détecter le foyer épileptogène.

I.C.1 - L'électroencéphalogramme (EEG)

La chirurgie est envisageable uniquement pour les formes partielles si le foyer épileptogène a été identifié et si la zone ciblée n'est pas importante d'un point de vue fonctionnel. La principale technique de localisation de la zone cervicale malade reste l'EEG. Cette technique permet un enregistrement de l'activité cérébrale de surface ou bien l'étude de zones plus profondes du cerveau, comme l'hippocampe. L'implantation des électrodes dans le cerveau est définie par la zone du cerveau à étudier. La différence d'amplitude du signal (figure 1) entre une zone témoin et une zone cérébrale pendant la crise permet d'identifier le foyer épileptogène.



Figure 1 : Électroencéphalogramme d'hippocampe humain atteint d'épilepsie du lobe temporal au début d'une crise avec implantation intra-cérébrale des électrodes (Wendling *et al.*, 2009).

Cette technique, bien que fiable, reste difficile à mettre en œuvre et nécessite une induction des crises chez le patient. C'est pourquoi les techniques d'imagerie tendent à remplacer cette méthode dans la localisation du foyer.

I.C.2 - La tomographie à émission de positons (PET)

La tomographie à émission de positons a été une des premières techniques d'imagerie envisagée dans le diagnostic de l'épilepsie. Elle repose sur l'utilisation différentielle du glucose entre une zone épileptogène et une zone cérébrale saine. Le suivi du métabolisme du glucose est effectué par radiomarquage au fluor du composé pour obtenir le ^{18}F -fluorodéoxyglucose. Les foyers épileptogènes étant hypométaboliques en dehors des crises (Kuhl *et al.*, 1980), ceux-ci apparaissent plus sombres sur les images obtenues par

rapport à un sujet sain, ou à la même zone dans l'autre hémisphère pour les épilepsies unilatérales (figure 2).

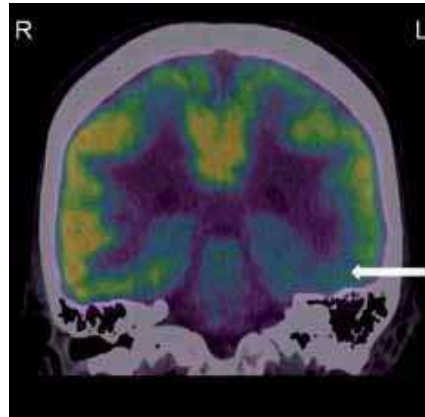


Figure 2 : Tomographie à émission de positons avec du ^{18}F -fluorodéoxyglucose en période inter-ictale. Le foyer épileptogène est indiqué par la flèche blanche (Lai *et al.*, 2010).

Cette technique ne peut être utilisée pendant les crises en raison de la durée nécessaire au composé pour atteindre le cerveau (plus de 40 minutes après l'injection) (Lai *et al.*, 2010). La détection de malformations corticales induisant des crises peut quant à elle être réalisée grâce à du tryptophane possédant un groupement méthyle marqué au ^{11}C en position alpha (Wakamoto *et al.*, 2008). En effet, certains foyers épileptiques possèdent une modification de la consommation en tryptophane.

I.C.3 - La tomographie à émission monophotonique (MET)

Également appelée SPECT (pour single-photon emission computed tomography), cette tomographie est réalisée avec de l'oxime amino-hexaméthylpropylénique marqué au technicium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO) ou de l'ester éthylcystéinate diéthylique marqué au technicium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD). La concentration de ces composés est fonction de l'importance du flux sanguin. Ainsi, le foyer épileptogène émettra un signal plus intense pendant une crise que dans le reste du cerveau car l'augmentation du flux sanguin est en corrélation avec les crises d'épilepsie (Zhao *et al.*, 2007).

I.C.4 - La résonance magnétique (MR)

Il s'agit d'un ensemble de techniques, chacune mesurant un élément différent en relation avec l'épilepsie. Elles sont listées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Techniques de résonance magnétique (MR) utilisées dans le diagnostic de l'épilepsie avec entre parenthèses l'abréviation anglophone

Techniques de MR	Cibles étudiées	Relation avec l'épilepsie
Spectroscopique	N-acétylaspartate, créatine, phosphocréatine et choline	Taux de N-acétylaspartate plus faible dans le foyer épileptique. Créatine, phosphocréatine et choline utilisées comme témoins (Zahr <i>et al.</i> , 2009)
Volumétrie	Taille des structures cérébrales reliées à l'hippocampe	Les structures fonctionnelles contenant les foyers épileptiques ont un volume plus faible que les structures identiques saines. Plus la structure est reliée directement à l'hippocampe, plus cette perte sera observable (Szabó <i>et al.</i> , 2006)
Imagerie de la tension de diffusion (DTI)	Diffusion anisotropique de l'eau, en particulier dans la matière blanche	Les crises épileptiques peuvent provoquer une lésion des tissus cérébraux au niveau du foyer épileptogène conduisant à une diminution de l'anisotropie fractionnelle (Riley <i>et al.</i> , 2010)
Avec activation par le taux d'oxygène sanguin (BOLD)	Flux sanguin	La perte de fonction dans la zone épileptogène conduit à une diminution de l'irrigation sanguine (Pillai, 2010)
Marquage artériel (ASL)	Artères	Flux sanguin plus faible en période inter-ictale dans les foyers épileptogènes (Zhao <i>et al.</i> , 2007)

I.C.5 - Utilisation des différentes techniques dans le diagnostic

L'EEG a été la première technique utilisée et sert toujours de référence. Il s'agit cependant d'une technique contraignante qui a conduit à un développement important des techniques d'imagerie. Chacune a ses propres caractéristiques et celles-ci sont donc complémentaires les unes des autres. Ainsi la PET, qui a pour inconvénient de n'être pas assez fiable avec seulement 70% de localisation correcte dans l'hémisphère, peut être associée à la MET pour obtenir une réelle localisation du foyer dans 82% des cas (Buch *et al.*, 2008). Parmi toutes les techniques citées ci-dessus, seule la MR par activation par le taux d'oxygène sanguin est peu à peu laissée de côté pour l'épilepsie en raison d'une trop grande différence de réponse en fonction des patients et de ces difficultés techniques et conceptuelles.

I.D - Traitements médicamenteux

Plusieurs médicaments sont actuellement disponibles pour traiter l'épilepsie, supprimer les crises ou atténuer leurs fréquences et leurs intensités. Les mécanismes d'action des principes actifs sont pour la plupart élucidés (Patsalos, 2005) et ceux-ci, dont certains donnés à titre d'exemple entre parenthèses, peuvent être classés en fonction de leurs cibles.

-Blocage des canaux sodiques voltage-dépendants (carbamazépine, acide valproïque, phénytoïne, lamotrigine, topiramate, zonisamide)

-Blocage des canaux calciques de type T (éthosuccimide, acide valproïque, lamotrigine, zonisamide)

-Renforcement de la voie métabolique et de la neurotransmission par l'acide γ -aminobutyrique (GABA). Le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur des neurones corticaux. L'utilisation de médicaments appartenant à cette classe a pour but de diminuer l'apparition

des crises en réduisant l'activation synchrone des neurones. (benzodiazépines, barbituriques, acide valproïque, topiramate)

-Blocage de la voie métabolique et de la neurotransmission par le glutamate. Cette voie est antagoniste à celle GABAergique et un blocage de cette voie entraînera un effet anticonvulsivant. (acide kaïnique (KA), N-méthyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalolepropionate (AMPA), MK-801, topiramate).

La connaissance des mécanismes d'action de ces molécules permet de mettre en évidence l'implication plus ou moins importante de certaines voies dans l'épilepsie. Deux approches différentes peuvent alors être envisagées pour l'élaboration de nouveaux traitements : D'une part trouver de meilleures cibles dans les voies mises en évidence ou des molécules plus actives sur les cibles connues, et d'autre part l'élucidation de nouvelles voies impliquées dans l'épilepsie. Ces deux approches sont complémentaires l'une de l'autre et nécessaires au regard de la diversité des formes d'épilepsie.

II - Présentation des différents types de modèle animal

II.A - Avantage des modèles animaux

Les études sur l'homme étant déontologiquement difficiles à réaliser, le recours à des modèles animaux est fréquent et nécessaire. Un grand nombre de modèles a été élaboré pour répondre au mieux à la complexité de l'épilepsie. Les modèles murins sont préférentiellement choisis en raison de leur très bonne reproduction et du faible coût d'entretien par rapport à d'autres animaux. Un choix doit être aussi fait sur le type de modèle animal :

- modèle génétique, avec des animaux convulsant spontanément
- modèle induit, pour lequel un stimulus physique ou chimique induit les crises
- modèle induit dont la réponse dépend du fond génétique

II.B - Les modèles génétiques

II.B.1 - Les modèles obtenus par sélection

Certaines souris ont été sélectionnées en raison de leur aptitude à convulser spontanément puis des études ont été menées afin de définir les anomalies génétiques sélectionnées en même temps que les souris. Cependant, ces modèles de souris sont assez peu utilisés, comme l'indique le faible nombre de publications pour une lignée précise. Parmi ces modèles, les souris C57BL/10Bg sps/sps présentent des crises spontanées ressemblant à la forme épilepsie/absence (Maxson *et al.*, 1983 ; Ortiz *et al.*, 1990). L'étude de cette lignée par rapport à la lignée parentale a ensuite permis de mettre en évidence plusieurs différences mais toutes impliquées dans une même voie de neurotransmission, la voie GABAergique.

Les lignées de rats présentant des crises épileptiques sans stimulation sont en revanche plus utilisées que les lignées de souris. La lignée GAERS constitue notamment un modèle répandu d'épilepsie/absence, permettant ainsi de comparer et de reproduire plus facilement les expériences et résultats des différentes équipes. L'étude de cette lignée, associée à une autre lignée dont les individus présentent des convulsions spontanées, permet également de

conforter des mécanismes qui pourraient être impliqués dans cette forme d'épilepsie (Gurbanova *et al.*, 2006).

Les modèles génétiques d'épilepsie obtenus par sélection sont donc utiles pour rechercher des mécanismes en relation avec une ou plusieurs formes d'épilepsie. Cependant, l'implication d'un gène n'est pas aisée avec ce type de modèle car la mutation est aléatoire et le lien avec cette mutation reste difficile à établir. Une autre approche de modèles génétiques a donc été conçue pour obtenir d'autres modèles génétiques d'épilepsie.

II.B.2 - Les modèles obtenus par génie génétique

La production de modèles génétique par Knock-out (KO) permet l'étude spécifique d'un gène. La méthode consiste à obtenir des animaux dont un des gènes est supprimé ou inactivé. Le croisement de souris ne possédant qu'un seul allèle du gène inactivé permet d'obtenir des souris de type sauvage (notées +/+), hétérozygotes (notées +/-) ou KO (notées -/-). La comparaison entre ces trois types de souris permet d'étudier spécifiquement l'impact de la suppression d'un gène. La voie de neurotransmission glutamatergique a par exemple pu être étudiée par inactivation du gène mGluR4, codant pour un type de récepteur de cette voie (Pekhletski *et al.*, 1996). Des études comportementales et biochimiques ont permis de montrer précisément l'implication de ce récepteur par rapport aux autres récepteurs de la même famille, notamment dans la relation entre la neuroplasticité synaptique et l'apprentissage.

II.C - Les modèles induits

II.C.1 - Les modèles induits par une stimulation physique

Les stimuli les plus fréquemment utilisés sont électriques, visuels ou auditifs. L'induction de crises par des décharges électriques, localisées dans une région cérébrale précise, a été décrite dès 1967 (Goddard, 1967) et la répétition de cette induction peut conduire à l'apparition de crises spontanées chez l'animal (Pinel et Rovner, 1978). Il s'agit d'un modèle efficace pour étudier l'influence de chaque zones cérébrales dans les différentes formes d'épilepsie (McIntyre *et al.*, 2002).

Alors que la stimulation par des décharges électriques a pour but de reproduire les décharges synchrones des neurones provoquant les crises épileptiques, l'utilisation de stimuli visuels ou auditifs sert à reproduire certains facteurs de crises chez l'Homme. Les modèles faisant appels aux stimuli visuels restent cependant peu utilisés, la plupart des études étant réalisées directement chez l'Homme.

II.C.2 - Les modèles induits par une stimulation chimique

Dans ce cas, l'animal est mis au contact d'un agent chimique qui est alors appelé convulsivant. Le mode d'administration le plus courant est l'injection intra-péritonéale et le composé le plus utilisé est le pentylènetétrazole. Quelle que soit la lignée de souris ou de rats testée, cette molécule induit d'abord des convulsions généralisées après l'injection, puis la réponse varie en fonction de la dose injectée, allant de quelques répétitions de convulsions brèves à la mort de l'animal (Chang et Myslinski, 1985 ; Homayoun *et al.*, 2002).

Cet agent chimique provoquant des convulsions chez tous les animaux, il est apparu comme un modèle approprié pour trouver des molécules anticonvulsivantes, servant ainsi de référence dans l'industrie pharmaceutique. Selon cette stratégie, différents extraits, issus d'un même organisme ou d'une même partie de cet organisme peuvent ainsi être directement administrés et les propriétés anticonvulsivantes testées (Park *et al.*, 2007). Une fois l'extrait sélectionné, la purification peut se poursuivre jusqu'à l'obtention de la molécule d'intérêt (Duarte *et al.*, 2008).

II.D - Les modèles induits dépendant du fond génétique

II.D.1 - Présentation du type de modèle

L'épilepsie est une neuropathologie aux mécanismes complexes et différents en fonction de la forme. L'implication d'un seul gène par les modèles génétiques ou la définition des causes par les modèles induits ne sont pas suffisants pour élucider tous les mécanismes conduisant aux différentes formes d'épilepsie. Le type de modèle le plus utilisé est donc le modèle induit dépendant du fond génétique (Cloix et Hévor, 2009). Que le modèle soit issu d'une sélection spécifique ou non, la démarche de l'étude reste la même.

La première étape consiste à réaliser une étude des voies de neurotransmission dans la lignée d'intérêt pour orienter les recherches suivantes et obtenir plus rapidement des résultats. La comparaison de la lignée d'intérêt avec une autre lignée constitue la deuxième étape. La seconde lignée peut être une lignée très bien décrite dans la littérature et servant régulièrement de référence, comme la lignée de souris C57BL/6J, ou bien une lignée ayant une réponse au stimulus opposée à celle de la lignée étudiée. Un modèle efficace permet alors d'entreprendre la troisième étape, le test d'anticonvulsivants.

II.D.2 - Modèle sans sélection spécifique

Certaines lignées ou certains individus d'une espèce présentent naturellement une sensibilité à un stimulus précis alors que les autres lignées ou les autres individus sont insensibles. Cette sensibilité au stimulus dépend donc du fond génétique. La plupart des modèles non sélectionnés ont des crises provoquées par un stimulus physique. Par exemple, la gerbille est une espèce dont certains individus convulsent quant ils sont tenus par la queue. À l'inverse, tous les individus de la lignée de souris DBA/2J convulsent avec des stimuli auditifs, sans pour autant que les autres lignées de souris ne convulsent avec ces mêmes stimuli (Chung et Johnson, 1984).

Les souris DBA/2J ont été d'abord utilisées pour l'étude des crises d'épilepsies provoquées par un stimulus auditif. Cette lignée a ensuite été étudiée pour les mécanismes d'apparition des crises lors du sevrage alcoolique. La caractérisation de la lignée a permis d'impliquer préférentiellement un groupe de récepteur de la voie de neurotransmission GABAergique, les GABA_B, et un groupe de récepteur de la voie de neurotransmission sérotoninergique, les 5-HT₂ (Jazrawi et Horton, 1989 ; Marrosu *et al.*, 2006 ; Reilly *et al.*, 2008).

En comparant le génome des DBA/2J et celui d'autres lignées, des anomalies génétiques ont pu être mises en évidence. Une corrélation entre des modifications du

chromosome 15 et les crises d'épilepsies a pu être faite (Ferraro *et al.*, 2010). D'autres gènes ont également été impliqués indépendamment. Parmi ceux-ci, Asp-1 et Asp-2 (pour audiogenic seizure prone) situés respectivement sur les chromosomes 12 et 4. Les protéines codant pour ces gènes interviennent dans l'activité de la Ca²⁺-ATPase (Neumann et Seyfried, 1990). Le modèle a par ailleurs été choisi très rapidement pour tester des anticonvulsivants aux crises audiogéniques (Buckholtz, 1975). D'autres molécules ont ensuite été testées, dont la dernière, le levetiracetam (Marrosu *et al.*, 2007).

II.D.3 - Modèle avec sélection spécifique

Des lignées de souris peuvent être obtenues par pression de sélection avec un agent convulsivant, le plus souvent chimique. Le but est de sélectionner simultanément plusieurs caractères conduisant à une forte sensibilité ou à une forte résistance à cet agent. Il est préférable de connaître au mieux l'implication du convulsivant utilisé pour la sélection, et notamment la voie de neurotransmission ou métabolique ciblée, afin de pouvoir relier d'éventuelles différences à l'apparition des crises.

Ce type de modèle est encore peu répandu car récent. De plus, l'obtention de lignées consanguines nécessite une longue période. Parmi les modèles murins, la sélection est souvent opérée à partir de plusieurs lignées consanguines, comme pour le modèle BS/BR (Chapouthier *et al.*, 1998). Les caractéristiques de cette lignée étant parfaitement décrites, la comparaison entre les souris sélectionnées et la lignée parentale sera par la suite facilitée.

II.E - Modèle pour l'étude de l'épilepsie et du métabolisme glucidique

Les crises d'épilepsies sont généralement associées avec un dérèglement du métabolisme glucidique, qui peut d'ailleurs servir à l'identification du foyer épileptogène chez le patient (Chapitre I.C.2, pages 18-19). Il a été notamment démontré que le taux de glycogène diminuait dès le début des convulsions généralisées (Dalsgaard *et al.*, 2007 ; Sacktor *et al.*, 1966). Les nombreuses anomalies observées dans le métabolisme glucidique dans les foyers épileptogènes laissent penser que plusieurs gènes pourraient être impliqués dans l'apparition des crises. Cependant, aucun modèle induit dépendant du fond génétique et développé auparavant ne semblait prendre en compte l'aspect du métabolisme glucidique comme facteur lié à l'épilepsie.

Il a donc été décidé de créer un nouveau modèle chimiquement induit et dépendant du fond génétique, ce type de modèle étant adapté à l'étude simultanée de plusieurs gènes. Parmi les molécules répertoriées comme convulsivants, la méthionine sulfoximine est apparue comme un bon agent de sélection pour obtenir un modèle animal d'épilepsie chimiquement induit. Cet agent convulsivant agissant également sur la voie métabolique glucidique, l'étude des relations entre les crises épileptiques et le métabolisme glucidique cérébral pourra ainsi être facilitée.

III - Présentation de la méthionine sulfoximine (MSO)

III.A - Caractéristiques de la molécule

La méthionine sulfoximine est reconnue comme un agent convulsivant depuis les années 1950 et a été initialement isolé à partir de farines alimentaires animales blanchies par une méthode utilisant le trichlorure d'azote, le processus d'agénéisation. Les animaux qui étaient alimentés avec ces farines présentaient des troubles du comportement ainsi que des crises épileptiformes avec des convulsions généralisées (Bentley *et al.*, 1951). Ces crises sont similaires à celles observées dans la forme la plus grave d'épilepsie humaine, nommée " Grand Mal ".

Trois décennies plus tard, la méthionine sulfoximine a été découverte comme molécule végétale naturelle. Toutes les plantes à partir desquelles la molécule a été purifiée appartiennent à la famille des *connaraceae* mais les parties des plantes dans lesquelles la méthionine sulfoximine a été retrouvée diffèrent en fonction de l'espèce végétale (Jeannoda *et al.*, 1985).

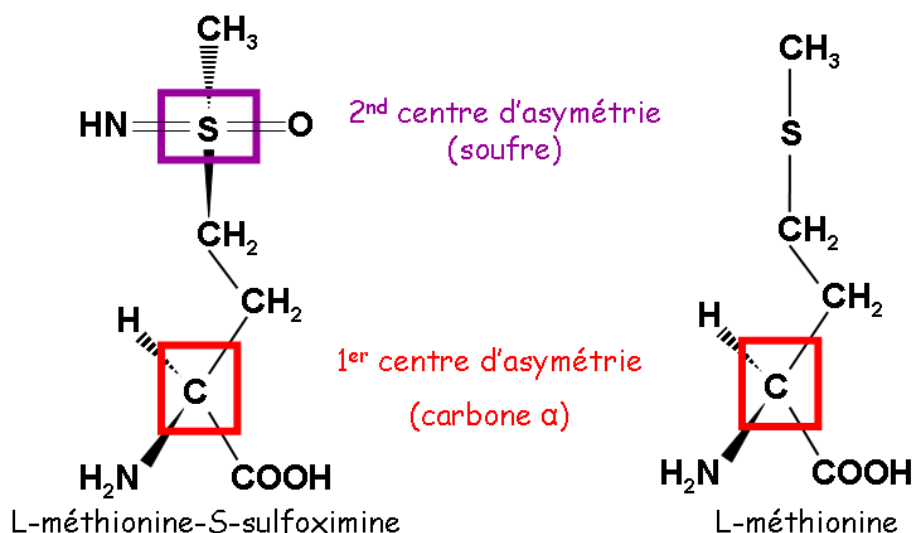


Figure 3 : Formules chimiques de la méthionine sulfoximine et de la méthionine

La méthionine sulfoximine est un dérivé de la méthionine (figure 3) qui possède deux centres d'asymétrie, au niveau du carbone α et du soufre. Parmi les quatre isomères possibles, seule la forme L-méthionine-S-sulfoximine est active (Manning *et al.*, 1969 ; Rowe et Meister, 1970). L'action de l'acide hydrazoïque sur la L-méthionine conduit à la synthèse de L-méthionine-R,S-sulfoximine (MSO) (Bentley *et al.*, 1951). La L-méthionine-S-sulfoximine peut être purifiée par chromatographie mais le mélange de formes R et S est le plus utilisé pour les expérimentations, y compris au sein du Laboratoire de Neurobiologie.

L'injection de MSO à 75mg/kg chez la souris provoque d'abord une ataxie et une akinésie puis, après 6 à 8 heures, l'apparition de crises tonico-cloniques généralisées qui peuvent être enregistrées par EEG. Les crises sont récurrentes pendant 24 à 48 heures, constituant une phase appelée *status epilepticus* durant laquelle les animaux peuvent mourir.

L'utilisation de ce convulsivant facilite donc l'étude avant, pendant et après les convulsions généralisées observées chez l'animal.

III.B - Les cibles de la MSO

Ce convulsivant a comme principale cible d'action la glutamine synthétase (Lamar et Sellinger, 1965 ; Ronzio *et al.*, 1969), une enzyme intervenant dans la voie métabolique du glutamate, un neurotransmetteur excitateur. Trois autres enzymes appartenant à cette même voie métabolique, l'alanine aminotransférase, la glutamine transaminase et la glutamate déshydrogénase, ont également leurs activités modifiées par la MSO (Dadsetan *et al.*, 2011 ; Lamar et Sellinger, 1965 ; Makar *et al.*, 1994). Il est admis aujourd'hui que cette voie de neurotransmission est la principale voie affectée par la MSO, notamment par l'inhibition de la glutamine synthétase (Eid *et al.*, 2008 ; Griffith et Meister, 1978 ; Lamar et Sellinger, 1965 ; Ronzio *et al.*, 1969). Ce mécanisme d'action a toutefois fait l'objet de controverses car le taux de glutamate mesuré en présence de MSO est inférieur à celui mesuré dans des conditions standards (Fonnum et Paulsen, 1990 ; Somers et Beckstead, 1990).

La voie métabolique glucidique, en relation étroite avec la voie glutamatergique, est également modifiée par la MSO, même si tous les mécanismes n'ont pas été élucidés. D'une part, l'activité et la quantité de fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) augmentent en présence de MSO (Hevor *et al.*, 1986 ; Vergé et Hevor, 1995). La MSO augmente également la quantité d'ARNm de la FBPase cérébrale *in vivo* et *in vitro* (Bernard-Hélary *et al.*, 2002).

D'autre part, il a été démontré très tôt que la MSO est un agent glycogénique (Folbergrová *et al.*, 1969) et cette relation a été confirmée par la suite (Bernard-Hélary *et al.*, 2002 ; Swanson *et al.*, 1989). L'accumulation de glycogène provoquée par la MSO conduit à la production dans le cerveau de particules qui, dans des conditions normales, ne sont observables que dans le foie (Phelps, 1975). L'étude de la MSO sur un modèle animal est donc un choix judicieux pour comprendre l'épilepsie, en particulier les relations entre l'épileptogénèse et les altérations métaboliques glucidiques cérébrales.

La MSO affecte enfin la formation du glutathionne en ciblant l' α -glutamylcystéine synthétase, qui catalyse la réaction limitante dans la production du glutathionne (Orlowski et Wilk, 1975). Une inhibition de cette enzyme peut conduire à l'apparition d'une cataracte.

IV - Sélection d'un modèle murin pour l'étude de l'effet de la MSO

Il a été démontré au laboratoire que les réponses épiléptogéniques et métaboliques à la MSO sont dépendantes du fond génétique chez la souris (Bernard-Hélary *et al.*, 2000). Le but de la sélection était d'obtenir un modèle composé de deux lignées de souris. La première lignée devait être sensible à la MSO alors que la seconde devait être résistante. Le critère retenu pour évaluer la sensibilité d'une souris à l'injection d'une dose fixe de MSO a été le temps de latence aux convulsions généralisées.

IV.A - Le brassage génétique

Le brassage génétique de lignées sans pression de sélection permet d'obtenir une génération de souris pouvant posséder plusieurs facteurs génétiques conduisant soit à la sensibilité au convulsivant, soit à la résistance. Huit lignées de souris ont été retenues en fonction de leurs caractéristiques propres vis-à-vis de leurs réponses à différents stimuli convulsivants. Il existe pour ces huit lignées une corrélation positive entre deux des différentes caractéristiques déterminées, la latence de convulsions à la MSO et la variation du taux de glycogène cérébral après administration de ce convulsivant, suggérant une dépendance entre ces deux réponses (figure 4).

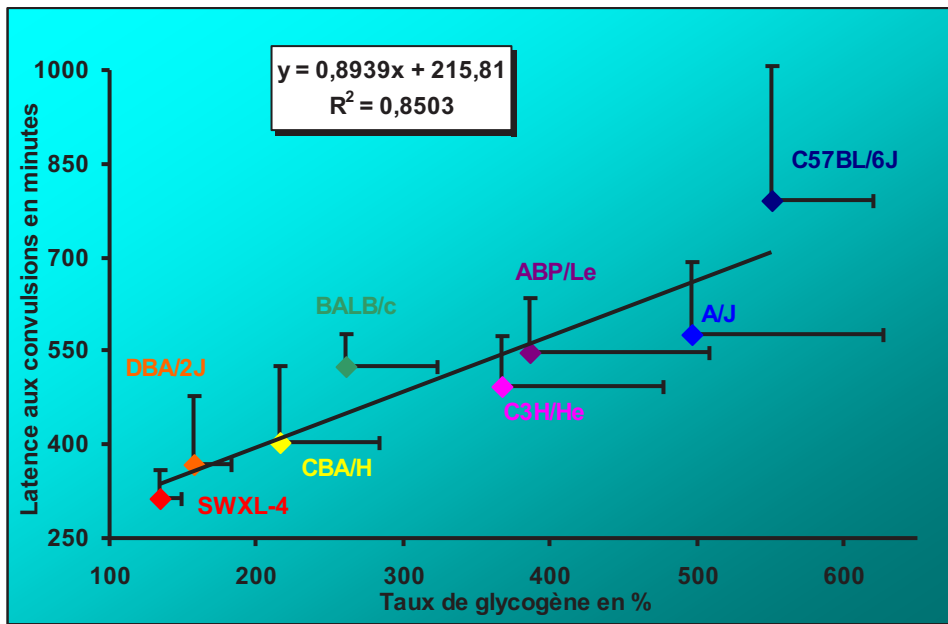


Figure 4 : Corrélation entre la latence et le taux de glycogène après injection de MSO
Un taux de glycogène de 100% correspond au taux de glycogène mesuré après injection de sérum physiologique (Cloix *et al.*, 2010a)

Une succession de 3 croisements a été réalisée pour brasser les lignées, produisant ainsi la génération G0 pour laquelle les souris ne sont pas consanguines (figure 5). Les huit lignées de départ sont appelées lignées parentales.

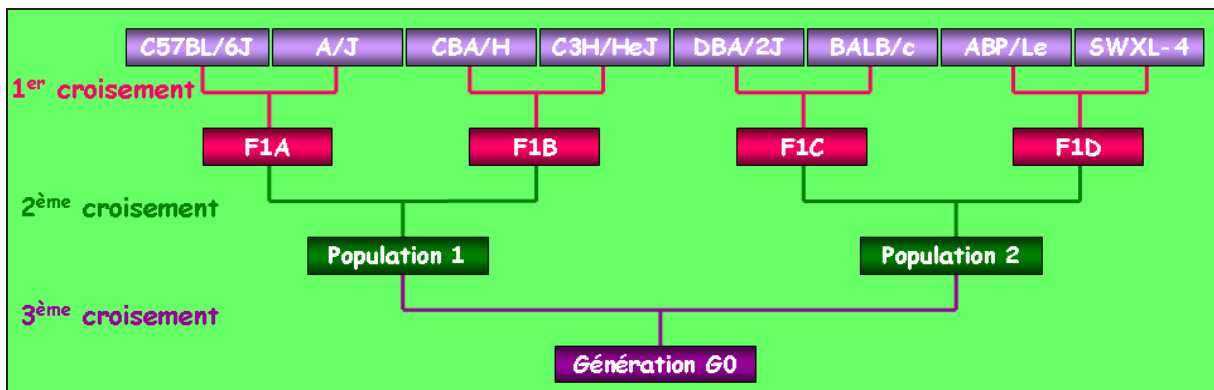


Figure 5 : Croisements entre les huit lignées parentales pour obtenir des souris de génération G0 brassée génétiquement (Cloix *et al.*, 2010b).

IV.B - La sélection par la MSO

La sélection par injection d'une dose de 75 mg/kg de MSO a été commencée sur la génération G0 (figure 6). En raison d'une mortalité non négligeable des souris aux premières étapes de la sélection après injection de MSO, les seules souris retenues pour l'étape suivante correspondaient à celles dont la réponse à la MSO n'induisait pas de mortalité (Cloix *et al.*, 2010b).

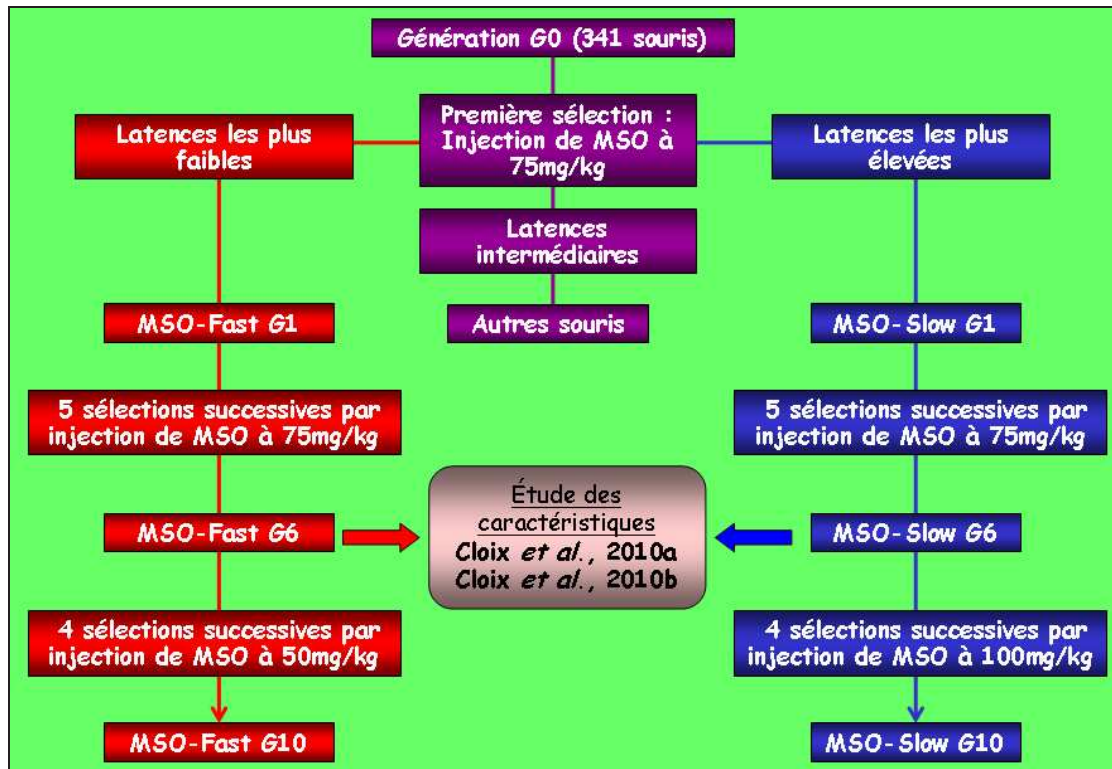


Figure 6 : Sélection des lignées par la MSO sur dix générations
Les croisements pour chaque génération sont réalisés entre 16 mâles et 16 femelles.

Au cours de ces étapes, plusieurs règles ont été respectées pour réaliser les croisements. Ces règles sont, par ordre d'importance :

- Aucun croisement frère/sœur
- Réalisation de 16 croisements pour chaque lignée, à chaque étape de la sélection
- Pour les MSO-Fast, le mâle ayant la latence la plus faible a été mis en accouplement avec la femelle ayant la latence la plus faible. Parmi les mâles restants, celui ayant la latence la plus faible a été mis en accouplement avec la femelle ayant la latence la plus faible parmi les femelles restantes, et ainsi de suite.
- La procédure ci-dessus a été suivie pour les MSO-Slow, mais en sélectionnant les souris ayant les latences les plus élevées.

Après six sélections suivies de croisements, la génération G6 a été obtenue et une caractérisation plus avancée a été réalisée (Cloix *et al.*, 2010a ; Cloix *et al.*, 2010b). Les premières informations concernent l'effet dose 50 (ED₅₀) de 36,1 mg/kg pour les MSO-Fast G6 et de 124,9 mg/kg pour les MSO-Slow G6. La latence, à dose équivalente, est plus faible pour les MSO-Fast (380 minutes) que pour les MSO-Slow (586 minutes).

Des informations complémentaires ont été obtenues par l'injection de convulsivants et d'anticonvulsivants, spécifiques de différentes voies de neurotransmission. Une différence dans la voie de neurotransmission glutamatergique est ainsi apparue entre les deux lignées de génération G6 (Cloix *et al.*, 2010b). La variation du taux de glycogène induite par la MSO est également différente en fonction de la lignée, tout comme la sérotonine, un des neurotransmetteurs régulant la voie glutamatergique (Cloix *et al.*, 2010a).

Les premières étapes de la sélection par la MSO ont induit une différence de réponse, notamment au niveau du métabolisme glucidique sur la génération G6. La pression de sélection a ensuite été augmentée sur quatre générations suivantes en ajustant les doses de MSO en fonction de la lignée. Une dose de MSO de 100mg/kg a été utilisée pour la sélection des souris MSO-Slow alors que les MSO-Fast ont été sélectionnées avec une dose de 50mg/kg afin de mieux distinguer les souris les plus sensibles.

IV.C - L'obtention de lignées consanguines

Après la génération G10, 10 croisements consanguins ont été réalisés pour obtenir les lignées consanguines MSO-Slow et MSO-Fast. Les accouplements ont donc été réalisés uniquement entre frères et sœurs afin de fixer les caractères de résistance ou de sensibilité à la MSO. Un contrôle a été effectué sur les souris après 7 croisements consanguins afin de vérifier que les caractères vis-à-vis de la MSO étaient conservés. Ce contrôle est présenté dans les Résultats de la Première partie en pages 54 et 55. Les lignées de souris ayant maintenu leur résistance ou leur sensibilité à la MSO, les croisements consanguins ont été poursuivis jusqu'à l'obtention récente d'une lignée MSO-Fast et d'une lignée MSO-Slow, toutes deux consanguines.

En parallèle de notre sélection, un autre modèle utilisant la MSO a été développé (Eid *et al.*, 2008). Il s'agit d'un modèle de rat chimio-induit reproduisant l'épilepsie du lobe méso-temporal. La microinfusion chronique de MSO au niveau de l'hippocampe permet d'obtenir des crises récurrentes mimant cette forme d'épilepsie. Le choix de la MSO comme agent de sélection a donc été pertinent et l'étude des lignées MSO-Fast et MSO-Slow pourrait conduire à l'élucidation de certains mécanismes impliqués dans la forme humaine d'épilepsie la plus grave.

PREMIÈRE PARTIE :
Comparaison *in vivo* des
lignées MSO-Slow et
MSO-Fast

Confirmation d'une différence dans la voie de neurotransmission glutamatergique entre les lignées MSO-Slow et MSO-Fast consanguines par injection de convulsivants et d'anticonvulsivants, y compris la MSO, et étude comportementale.

Introduction

La sensibilité des lignées MSO-Fast et MSO-Slow à la MSO a été établie à chaque croisement au cours de la sélection des lignées. Cependant, cette étude de la sensibilité doit également être complétée par une étude du mécanisme d'action du convulsivant. L'étude de l'implication de certaines voies de signalisation dans notre modèle murin doit permettre d'obtenir les premiers résultats qui vont déterminer les principales études biochimiques à mener par la suite.

I - Les voies glutamatergique et GABAergique dans les neuropathologies

Le glutamate et le GABA sont des neurotransmetteurs étroitement liés, aux effets antagonistes l'un de l'autre, le premier étant excitateur des neurones et le second inhibiteur (Li *et al.*, 2010 ; Schousboe, 2003). Cependant, ces neurotransmetteurs partagent une grande partie de leurs voies de biosynthèse dans lesquelles se trouve la glutamine synthétase, une des cibles de la MSO (Griffith et Meister, 1978 ; Lamar et Sellinger, 1965 ; Ronzio *et al.*, 1969).

Un problème de régulation dans l'une des deux voies peut conduire à un déséquilibre, entraînant ainsi une neuropathologie. Il a par exemple été démontré (figure 7) que seule une bonne régulation de l'équilibre glutamate/GABA protégeait des troubles de l'anxiété (Wieronska et Pilc, 2009).

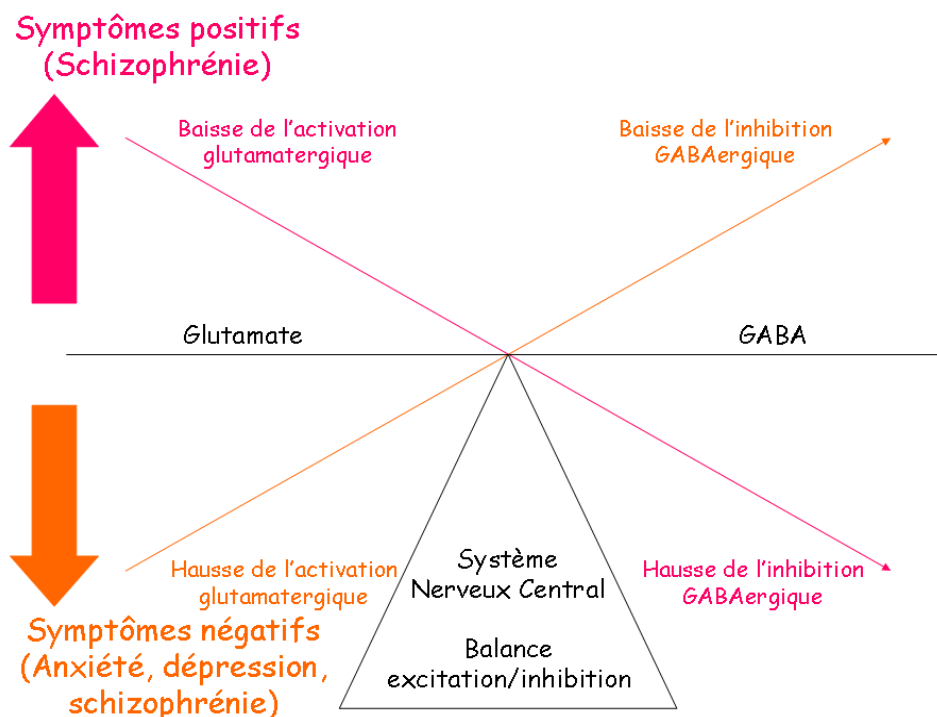


Figure 7 : Schéma de la balance des voies glutamatergique et GABAergique dans des troubles comportementaux (Wieronska et Pilc, 2009).

Il est donc difficile d'impliquer uniquement une seule des deux voies en cas de dysfonctionnement. La recherche concernant ces voies est d'autant plus compliquée que les voies glutamatergique et GABAergique sont elles-mêmes associées ou régulées par d'autres voies de neurotransmission. Une bonne connaissance des voies de signalisation, et notamment des récepteurs et de leurs ligands, est donc nécessaire pour préparer au mieux les études et extraire le maximum d'information des résultats obtenus. Ainsi, des études comportementales ou l'utilisation de molécules pharmaco-actives ciblant une voie déterminée de neurotransmission sont des outils efficaces pour impliquer ou écarter un mécanisme principal dans l'action du convulsivant.

II - La voie de signalisation glutamatergique

Le passage de l'information est effectué entre deux neurones au niveau de la synapse qui peut être physique ou chimique. Les neurotransmetteurs sont utilisés uniquement par les synapses chimiques. Dans ce cas, les neurones ne se touchent pas et l'espace entre les deux est appelé fente synaptique. Le neurone transmettant l'information est alors le neurone pré-synaptique et celui recevant l'information est le neurone post-synaptique. La voie glutamatergique constitue la principale voie de neurotransmission du système nerveux central. Le glutamate induit un signal excitateur post-synaptique grâce à une augmentation de la concentration cytosolique en cation de celui-ci.

II.A - Le neurone pré-synaptique

Le glutamate cytosolique doit tout d'abord changer de compartiment pour entrer dans les vésicules permettant la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique. L'entrée d'une charge positive, sous forme de proton, grâce à une ATPase magnésium dépendante permet de créer un potentiel de membrane servant au passage du glutamate dans la vésicule *via* les transporteurs VGLUT1 et 2. Ceux-ci sont complémentaires et sont co-exprimés dans les membranes vésiculaires et pré-synaptique (Moriyama et Omote, 2008). Le glutamate contenu dans les vésicules est alors libéré dans la fente synaptique par fusion des membranes vésiculaires et cytoplasmiques pré-synaptiques.

II.B - Les récepteurs post-synaptiques

Pour transmettre le signal, le glutamate libéré dans la fente synaptique doit interagir avec les récepteurs glutamatergiques ionotropes ou métabotropes présents sur le neurone post-synaptique.

II.B.1 - Les récepteurs glutamatergiques ionotropes

Les récepteurs glutamatergiques ionotropes se divisent en trois classes en fonction des molécules agonistes, spécifiques de chaque classe, qui sont le N-méthyl-D-aspartate (NMDA), l'acide kaïnique (récepteur kaïnate) et l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazolpropionique (AMPA). Il existe plusieurs sous-unités différentes appartenant à l'une des trois familles de récepteurs et dont la similarité de séquence est présentée en figure 8. Le nom des sous-unités est formé par les trois premières lettres du ligand (Glu pour glutamate), suivi de la première lettre de l'agoniste (N pour NMDA, A pour AMPA et K pour kaïnate) puis d'un chiffre et éventuellement d'une lettre qui

sont spécifiques à la sous-unité. Chaque sous-unité est codée par un gène différent mais peut avoir plusieurs variants d'épissage.

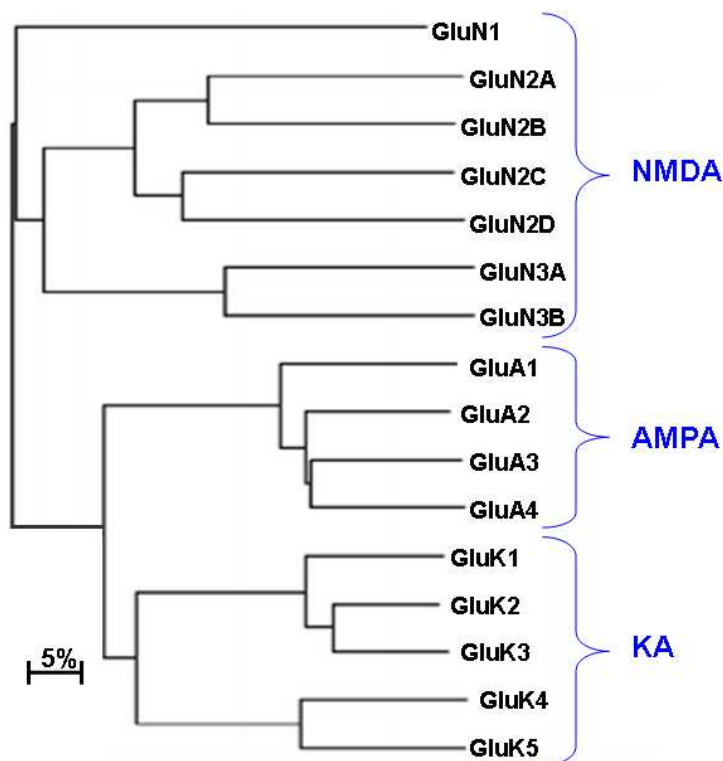


Figure 8 : Les sous-unités de récepteurs glutamatergiques ionotropes humains
Éloignement des séquences protéiques avec leurs noms donnés dans la nouvelle nomenclature (Collingridge *et al.*, 2009). Les séquences protéiques ont été obtenues sur la base de données ENSEMBL version 21 et alignée avec le logiciel ClustalX. Les longueurs des branches sont proportionnelles à l'éloignement entre les séquences par rapport à l'échelle située en bas à gauche (Kew et Kemp, 2005).

L'éloignement de séquence entre les récepteurs NMDA d'une part et les récepteurs kaïnates et AMPA d'autre part contribue à expliquer pourquoi les derniers ont des propriétés assez proches alors que les premiers ont plus de caractéristiques qui leurs sont spécifiques. Ainsi, les récepteurs NMDA permettent le passage aussi bien du sodium que du calcium vers l'intérieur de la cellule alors que les récepteurs AMPA et kaïnates privilégient l'entrée du sodium sur celle du calcium (Kew et Kemp, 2005 ; Perrais *et al.*, 2010). Les récepteurs NMDA et AMPA sont uniquement hétérotétramériques alors que les récepteurs kaïnates peuvent également être homotétramériques. Tous les récepteurs glutamatergiques ionotropes possèdent néanmoins la même organisation générale (figure 9).

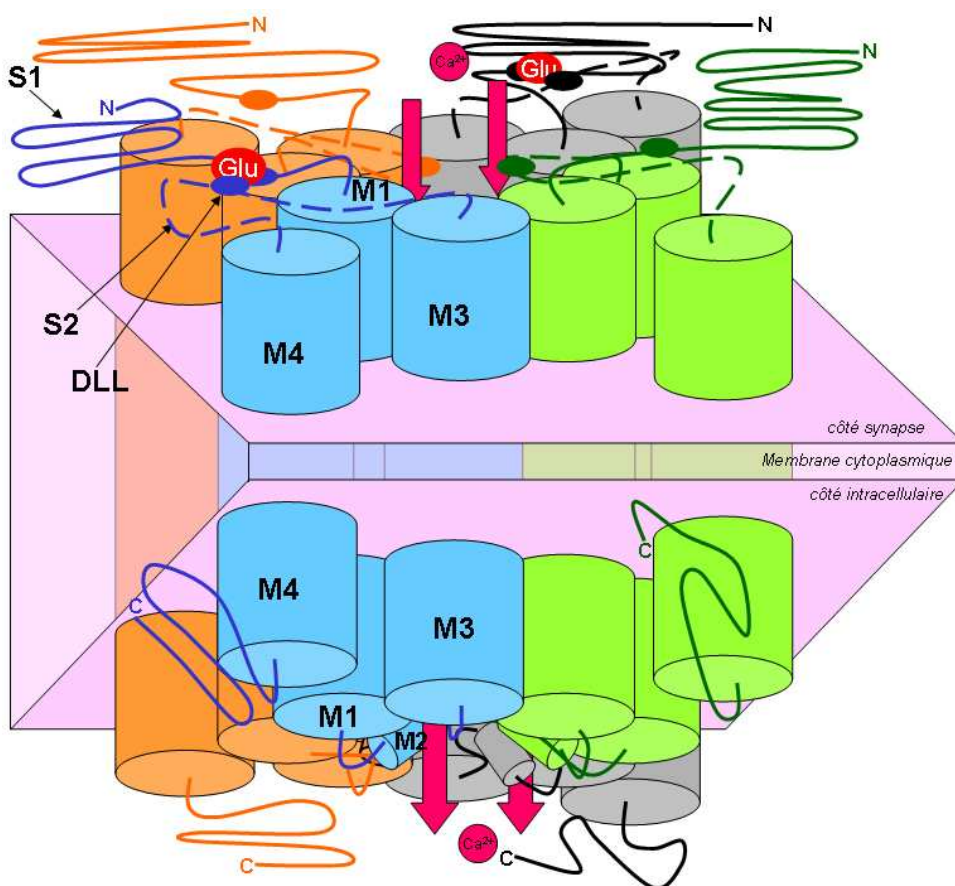


Figure 9 : Schéma d'un récepteur glutamatergique ionotrope.

Chaque sous-unité, représentée par une couleur spécifique, possède 4 domaines organisés en hélice α (M1 à M4) dont 3 sont transmembranaires (M1, M3, M4). Ces domaines sont représentés en forme de cylindre et les séquences entre les domaines sous forme de fil. DLL : Domaine de Liaison au Ligand, site de reconnaissance du glutamate

Le canal ionique est formé par les domaines M1 et M3 des 4 sous-unités et le domaine M2 permet de sélectionner les ions du côté cytoplasmique. Une partie du site de reconnaissance du glutamate est situé sur le domaine S1 et l'autre partie sur le domaine S2. L'interaction du glutamate (sous-unités bleue et grise) change la conformation du domaine S2 et autorise le passage du cation contrairement aux domaines S2 qui ne sont pas en interaction avec le glutamate (sous-unités verte et orange).

Une régulation fine mais complexe de l'information est ainsi autorisée dans l'activation glutamatergique grâce à la complexité de ces récepteurs. Deux domaines extracellulaires permettent la fixation du ligand alors que deux domaines transmembranaires participent à la formation d'un canal permettant le passage plus ou moins spécifique d'ions. Un domaine intracellulaire permet le contrôle de la sélectivité ionique (Bowie, 2010). Les récepteurs ionotropes sont proches structurellement des canaux potassiques, expliquant leurs préférences pour les cations (Wo et Oswald, 1994).

II.B.1.a - Les récepteurs de type NMDA

Les récepteurs NMDA fonctionnels se composent d'un dimère de GluN1 et d'un dimère de GluN2 dans lequel une sous-unité GluN2 peut être remplacée par une sous-unité GluN3 (Schorge et Colquhoun, 2003) mais seules les sous-unités GluN2 présentes dans le

tétramère peuvent se lier à du glutamate. Ces récepteurs sont activés plus lentement que les récepteurs kaïnates et AMPA.

II.B.1.b - Les récepteurs de type AMPA

Parmi les quatre sous-unités des récepteurs AMPA, GluA1 et GluA2 sont ubiquitaires (Sprengel, 2006). La sous-unité la plus importante dans la fonctionnalité des récepteurs AMPA est la GluA2 car elle détermine la perméabilité du récepteur aux ions Ca^{2+} . Le remplacement dans la majorité de ces sous-unités chez l'adulte d'une glutamine par une arginine en position 607 (Q627R) dans la région M2 augmente la charge positive du pore et diminue ainsi le passage de Ca^{2+} (Cotton et Partin, 2000 ; Kew et Kemp, 2005). Cette sous-unité est en outre essentielle pour la régulation de la transmission du signal et une diminution de son expression chez des souris conduit à la récurrence de crises épileptiques ainsi qu'une mort précoce à environ 3 semaines (Brusa *et al.*, 1995).

II.B.1.c - Les récepteurs de type kaïnate

Les sous-unités des récepteurs kaïnates sont divisées en deux groupes. Le premier est constitué des sous-unités ayant une forte affinité pour le glutamate (GluK4 et 5) alors que les sous-unités GluK1 à 3, appartenant au second groupe, ont une affinité plus faible pour le glutamate. Les sous-unités de forte affinité doivent être associées à des sous-unités de faibles affinités alors que les sous-unités de faible affinité peuvent être associées entre elles et également former des homotétramères.

Tout comme GluA2, une arginine peut remplacer une glutamine dans les sous-unités GluK1 (Q636R) et GluK2 (Q621R) et conduit alors à une diminution de la perméabilité au Ca^{2+} (Perrais *et al.*, 2010 ; Sailer *et al.*, 1999 ; Traynelis et Wahl, 1997).

II.B.2 - Les récepteurs glutamatergiques métabotropes

Les récepteurs métabotropes (mGluR) se divisent également en trois classes en fonction de leurs homologies de séquences, des protéines avec lesquelles ils sont couplés et des molécules pharmacologiques actives. Les récepteurs mGluR1 et mGluR5 sont couplés avec une phospholipase C par une protéine G_q , ou G_{11} , et constituent le groupe I. Les récepteurs mGluR2 et mGluR3 forment le groupe II et les récepteurs mGluR4 et mGluR6 à 8 appartiennent au groupe III. Les récepteurs de ces deux derniers groupes sont couplés à l'activité adénylate cyclase par une protéine G_i , ou G_o , (Danbolt, 2001). La différence entre le groupe II et le groupe III se situe au niveau des molécules pharmaco-actives.

Les récepteurs métabotropes se caractérisent également par un plus large panel de variants d'épissage par rapport aux récepteurs ionotropes. L'organisation des sous-unités entre elles est aussi différente puisque les récepteurs métabotropes ne sont exprimés que sous forme d'homodimères (Tsuji *et al.*, 2000). Chaque sous-unité possède une organisation caractéristique de récepteur couplé à une protéine G avec sept domaines transmembranaires, un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire. Le domaine de reconnaissance du glutamate est situé sur la partie N-terminal et la protéine G interagit au niveau du domaine C-terminal.

Excepté mGluR6 qui est exprimé uniquement au niveau de la rétine, les autres récepteurs se situent dans toutes les régions du cerveau. Chaque groupe a une répartition neuronale spécifique avec le groupe I essentiellement post-synaptique, le groupe II aussi bien pré-synaptique que post-synaptique et le groupe III essentiellement pré-synaptique (Wieronska et Pilc, 2009). Les membres du groupe I interviennent plus dans la propagation du signal glutamatergique que les récepteurs des autres groupes mais leur potentiel excitateur reste cependant plus faible que celui des récepteurs ionotropes, les conduisant à un rôle complémentaire des récepteurs AMPA et NMDA (Anwyl, 1999).

II.C - Activation des récepteurs glutamatergiques post-synaptiques

Les récepteurs glutamatergiques ionotropes possèdent une partie extracellulaire intervenant dans la reconnaissance du glutamate et une partie formant le canal ionique s'ouvrant en présence du neurotransmetteur. Les récepteurs, tétramériques, possèdent quatre sites de reconnaissance et la fixation d'un glutamate sur un site suffit à ouvrir partiellement le pore et à laisser passer des ions. Chaque sous-unité est indépendante et peut fixer un ligand différent des autres sous-unités (Rosenmund *et al.*, 1998). Le flux des cations peut alors varier en fonction du nombre de sous-unités activées et peut être facilité notamment par la phosphorylation des sous-unités des récepteurs ionotropes (MacDonald *et al.*, 1989).

La concentration en récepteur est importante dans l'intensité de la transmission du signal. Cette concentration peut facilement varier en fonction des besoins. Il s'agit de la neuroplasticité. Le nombre des récepteurs AMPA peut être par exemple régulé par l'activité des récepteurs NMDA (Salter *et al.*, 2009). D'autres récepteurs, nommés GluD1 et GluD2, permettent la formation de synapses et donc indirectement le recrutement des récepteurs post-synaptiques adaptés (Yuzaki, 2011). Ces récepteurs ont pendant longtemps été considérés comme orphelins car aucun ligand n'avait été trouvé pour les caractériser. Bien que leurs sous-unités aient des séquences et une organisation tridimensionnelle proches des sous-unités ionotropes, ces récepteurs ne forment pas de pores et ne peuvent pas fixer le glutamate (Lomeli *et al.*, 1993). Récemment, une protéine de la famille des cérébellines, Cbln1, a été trouvée comme ligand de GluD1 et GluD2 et le complexe a été impliqué dans la mise en place des synapses (Yuzaki, 2011).

D'autres molécules peuvent également activer ou moduler la fonctionnalité des récepteurs. La fixation de la glycine sur les sous-unités GluN1 est par exemple nécessaire à la fonctionnalité des récepteurs NMDA (Schorge et Colquhoun, 2003). Les autres voies de neurotransmission influent également sur l'activation des récepteurs NMDA. La dopamine augmente l'effet des récepteurs glutamatergiques alors que la sérotonine a un effet inhibiteur (Gu *et al.*, 2007 ; Yuen *et al.*, 2005).

Les dendrites neuronales contiennent des complexes protéiques pouvant interagir avec les récepteurs et moduler leurs fonctionnalités grâce à des changements de conformations ou à des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation. Les récepteurs AMPA possèdent des protéines spécifiques qui peuvent leur être associées, comme les protéines chaperonnes de la famille TARP (Transmembrane AMPA receptor Regulatory Proteins). Le kaïnate devient alors pour ces récepteurs AMPA un agoniste total (Nicoll *et al.*, 2006). Les activités des récepteurs kaïnates et NMDA peuvent quant à elles être modulées par les protéines, comme Neto1 (Perrais *et al.*, 2010).

Les récepteurs métabotropes de groupe I agissent quant à eux par la phospholipase C et les récepteurs des groupes II et III par l'adénylate cyclase et les canaux ioniques de la membrane cytoplasmique. Ces mécanismes d'action sont décrits ci-dessous en figure 10.

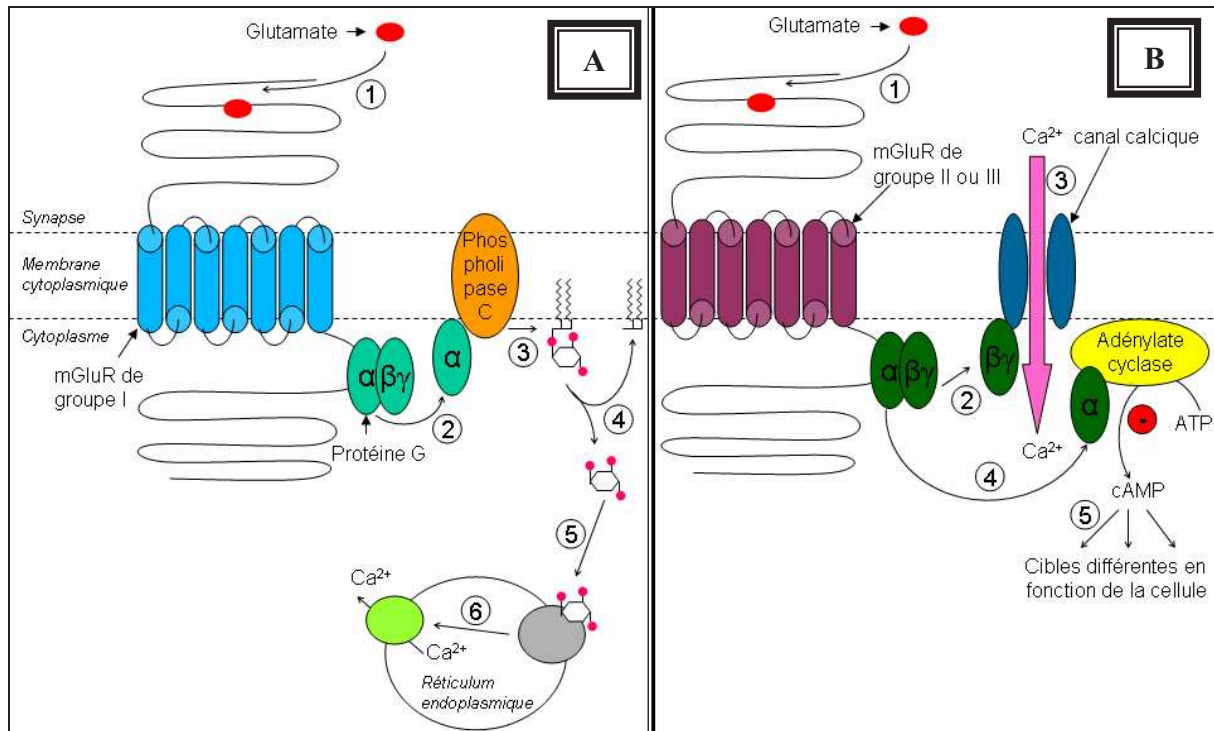


Figure 10 : Fonctionnement des récepteurs métabotropes.

- A) Activation d'un récepteur de groupe I avec les étapes suivantes : 1-Fixation du glutamate sur le récepteur. 2-Activation de la phospholipase C par la sous-unité α de la protéine G couplée au récepteur. 3-Action enzymatique de la phospholipase C sur le phosphatidyl-inositol-bisphosphate. 4-Libération de l'inositol-trisphosphate. 5-Fixation de l'inositol-trisphosphate sur un récepteur spécifique du réticulum endoplasmique. 6-Induction de la libération de calcium dans le cytoplasme par un transporteur calcique. B) Activation d'un canal calcique par un récepteur de groupe II ou III avec les étapes suivantes : 1-Fixation du glutamate sur le récepteur. 2-Activation du canal calcique par la sous-unité β de la protéine G couplée au récepteur. 3-Influx de calcium. 4-Inhibition de la production d'AMP cyclique (cAMP) par fixation de la sous-unité α de la protéine G sur l'adénylate cyclase. 5-Action sur les différentes voies en fonction du type cellulaire et de sa localisation tissulaire.

L'augmentation du calcium cytosolique peut provenir du milieu extracellulaire, comme c'est le cas pour les récepteurs ionotropes, mais également du réticulum endoplasmique.

II.D - Arrêt de la transmission du signal

Pour éviter une activation intempestive des récepteurs glutamatergiques, celui-ci passe par un stade de désensibilisation qui peut être bref ou long. Si la fixation d'un seul glutamate suffit à activer les récepteurs ionotropes, même partiellement, la fixation d'une seule molécule désensibilisatrice suffit à désactiver les quatre sous-unités du récepteur.

L'état désensibilisé de longue durée est provoqué chez les récepteurs NMDA par l'entrée de magnésium dans le canal. La concentration extracellulaire de ce cation divalent est nettement supérieure à la concentration intracellulaire. Il va donc rapidement entrer dans les

pores rendus accessibles par la fixation du glutamate mais ne va pas pouvoir en ressortir (Nowak *et al.*, 1984). Le zinc est quant à lui un inhibiteur des récepteurs kaïnates et de la sous-unité GluN2A des récepteurs NMDA (Mott *et al.*, 2001 ; Zheng *et al.*, 2001). Contrairement au mécanisme du magnésium, le zinc se fixe de manière allostérique sur les sous-unités cibles et il a été démontré pour GluK4 qu'une acidification du milieu inhibait l'interaction avec le zinc et réactivait le récepteur kaïnate (Mott *et al.*, 2001).

Les récepteurs métabotropes de groupe I permettent aussi au niveau post-synaptique une désensibilisation soit brève soit longue induite soit par mGluR1 soit par mGluR5 respectivement (Le Duigou *et al.*, 2011). Une réactivation durable sans inhibition peut être cependant réalisée par une forte dépolarisation, notamment générée par l'activation des récepteurs AMPA (Feldman *et al.*, 1999). Ce phénomène de réactivation durable, s'il est présent simultanément chez un grand nombre de neurones, peut conduire à certaines formes d'épilepsie (Huo *et al.*, 2006).

La diminution du nombre de récepteurs synaptiques apparaît aussi comme un moyen efficace pour limiter la transmission du signal. Les récepteurs AMPA et métabotropes du groupe I subissent une endocytose très rapide au niveau de la synapse, même sans fixation du glutamate (Dhami et Ferguson, 2006 ; Groc et Choquet, 2006). Ce phénomène, couplé à une exocytose forte, permet de s'adapter rapidement au besoin de la synapse. À l'inverse, les récepteurs NMDA restent plus longtemps à la surface du neurone et ne sont endocytés en masse que lors d'une période de désensibilisation longue (Groc et Choquet, 2006).

L'arrêt du signal peut également se produire en aval de la synapse, au niveau intracellulaire. Des récepteurs NMDA peuvent se situer sur la dendrite en dehors de la synapse. Ils ont alors la capacité d'antagoniser les différents signaux et mécanismes provoqués par l'activation des récepteurs NMDA synaptiques (Vanhoutte et Bading, 2003).

L'exotoxicité du glutamate a été démontrée aussi bien pour l'augmentation de la mort cellulaire que pour l'entretien des crises épileptiques (Bradford, 1995). Aussi, une élimination du glutamate de la synapse doit être rapide. La majorité du glutamate est captée par les astrocytes grâce aux transporteurs EAAT1 et EAAT2, aussi appelé respectivement GLAST et GLT-1 (Cremer *et al.*, 2010 ; Lehre et Danbolt, 1998 ; Storck *et al.*, 1992).

Une partie du glutamate est néanmoins récupérée par le neurone pré-synaptique grâce à des transporteurs ou à des récepteurs glutamatergiques pour une autorégulation (voir IV page 41, les récepteurs pré-synaptiques).

III - La voie de signalisation GABAergique

Les récepteurs GABA se divisent, comme les récepteurs glutamatergiques, en récepteurs ionotropes (GABA_A et GABA_C) et métabotropes (GABA_B). Chaque type de récepteurs est caractérisé par une molécule type qui permet de les différencier. Les récepteurs GABA_A sont bloqués par la bicuculline, le baclofène est un agoniste des récepteurs GABA_B et les récepteurs GABA_C sont bloqués par l'acide cis-aminocrotonique. La seule exception à cette classification concerne les trois sous-unités $\rho 1$ à 3 appartenant à la famille des GABA_A mais se comportant comme des sous-unités des récepteurs GABA_C (Olsen et Sieghart, 2008).

III.A - Les récepteurs GABAergiques ionotropes

Se divisant en récepteurs GABA_A et GABA_C, les récepteurs GABAergiques ionotropes permettent une transmission rapide du signal par le passage d'anions. Le canal permet essentiellement le passage des ions chlorures pour l'hyperpolarisation membranaire mais le signal inhibiteur peut parfois être initié par l'entrée d'ions bicarbonates (HCO₃⁻) (Kaila *et al.*, 1997).

Leur organisation spatiale en pentamère est caractéristique de la superfamille des récepteurs à boucle de cystéine. Les récepteurs ionotropes à acétylcholine, à sérotonine, à glycine et à zinc font également partie de cette superfamille mais seuls les récepteurs GABA_A et glycine permettent le passage d'anions *in vivo*. Les 19 sous-unités répertoriées pour les récepteurs GABA_A sont réparties en 8 sous-types, chacun identifié par une lettre grecque (α , β , γ , δ , ϵ , θ , π et ρ). Outre les nombreuses sous-unités pouvant s'associer entre elles, les variants d'épissage alternatif des sous-unités GABA_A augmentent l'hétérogénéité des récepteurs.

La structure exacte des récepteurs ionotropes GABAergiques n'est pour l'instant pas connue car aucun récepteur n'a été cristallisé. Les structures des récepteurs nicotiniques cérébraux et musculaires ont quant à elles déjà été élucidées (Miyazawa *et al.*, 2003 ; Unwin, 2005). Ces structures ont pu servir de référence pour l'étude de la structure des récepteurs GABAergiques *in silico* (Ci *et al.*, 2007).

L'organisation des récepteurs GABA_A est très différente de celle des récepteurs glutamatergiques ionotropes. Un seul domaine de chaque sous-unité, le M2, constitue le pore du canal. Il peut avoir deux positions pour les sous-unités α , contrôlant ainsi l'ouverture du canal. Il ne peut se fixer plus de deux molécules de GABA par récepteur GABAergique mais ces deux molécules sont nécessaires pour le passage de l'anion. Une partie de leurs domaines de fixation se situe sur les sous-unités α et l'autre sur les sous-unités β alors que le domaine de fixation des BDZ se situe en partie sur la sous-unité α et la sous-unité γ (Smith et Olsen, 1995). La fixation d'un des deux ligands éloigne la partie N-terminale de la sous-unité α vers l'arrière, redressant ainsi le domaine M2 comme le montre la figure 11 (sous-unité $\alpha\delta$). Sans ligand, ce domaine ferme le pore au niveau de la synapse (sous-unité $\alpha\gamma$) et empêche le passage de l'ion Cl⁻.

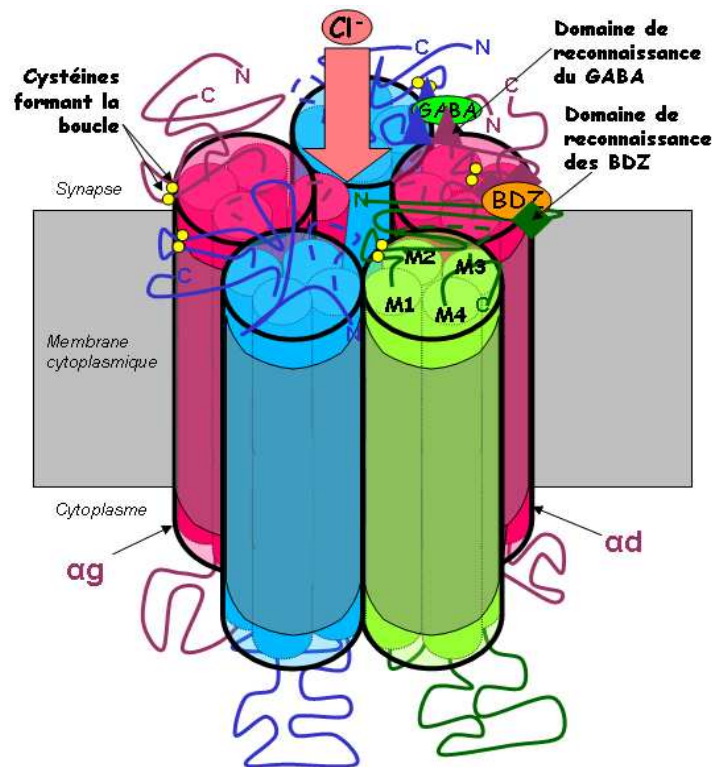


Figure 11 : Schéma d'un récepteur GABA_A.

Les sous-unités α sont en rose (avec une sous-unité à droite notée *ad* et une sous-unité à gauche notée *ag*), les sous-unités β en bleu et la dernière sous-unité (γ, δ, ε ou π) en vert. Une sous-unité α ou β peut être remplacée par une seconde sous-unité γ et une sous-unité θ peut remplacer une β. Les domaines transmembranaires sont notés M1 à M4. La boucle de cystéine et les domaines de fixation au GABA et aux benzodiazépines (BDZ) se situent dans la partie N-terminale.

Bien que le nombre théorique de récepteurs soit élevé, certaines préférences ont été enregistrées pour l'organisation des récepteurs, conduisant à la marginalisation ou à l'inexistence d'une grande partie des formes théoriques (D'Hulst *et al.*, 2009) :

- la plupart des récepteurs sont organisés en $2\alpha/2\beta/1\gamma$
- les sous-unités les plus fréquentes sont α_1 , β_1 , β_2 , β_3 et γ_2
- les récepteurs contiennent préférentiellement une seule isoforme α
- α_1 est souvent associé à β_2 et α_2 à β_3

Des récepteurs GABA_A présents dans la rétine ont longtemps été considérés comme des récepteurs GABA_C mais ils ne sont constitués en fait uniquement de sous-unités ρ. À l'inverse, les véritables récepteurs GABA_C ont été retrouvés dans d'autres parties du cerveau que la rétine (Denter *et al.*, 2010).

III.B - Les récepteurs GABAergiques métabotropes

Alors que les récepteurs ionotropes permettent directement le passage d'anion, les récepteurs métabotropes agissent indirectement sur plusieurs cibles. La transmission du signal par les récepteurs GABA_B est donc plus lente et conduit ces récepteurs à avoir un rôle de modulation du signal. C'est pourquoi leur localisation au niveau pré- et post-synaptique est complétée par une localisation extra-synaptique.

Il n'existe que deux sous-unités, GABA_{B1} et GABA_{B2}, qui ne sont fonctionnelles que dans un hétérodimère (Marshall *et al.*, 1999 ; Möhler et Fritschy, 1999). La sous-unité B1 possède cependant deux variants d'épissage fonctionnels qui ont très probablement des propriétés pharmacologiques différentes (Bettler et Tiao, 2006 ; Naseer *et al.*, 2011). La sous-unité B2 est quant à elle nécessaire pour le transport de l'hétérodimère fonctionnel vers la membrane cytoplasmique (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000). Ces deux sous-unités possèdent sept domaines transmembranaires comme les sous-unités des récepteurs métabotropes glutamatergiques, avec une partie N-terminale extracellulaire et une partie C-terminale intracellulaire. L'organisation en hétérodimère a conduit à une spécificité des sous-unités pour la fixation du GABA (sous-unité B1) et le couplage à la protéine G (sous-unité B2) (Havlickova *et al.*, 2002).

Ce récepteur est couplé à une protéine G_{0/i} qui contrôle l'activation post- et extra-synaptique des canaux potassiques voltage-dépendant pour une sortie de potassium dans le milieu extracellulaire et l'inhibition pré-synaptique des canaux calciques voltage-dépendant pour un blocage de l'entrée intracellulaire de calcium (Bettler *et al.*, 2004). La troisième cible est l'adénylate cyclase. Bien que ne possédant que deux formes différentes, ce récepteur a un large spectre d'action.

IV - Les récepteurs pré-synaptiques

Les récepteurs GABAergiques ont été les premiers à être impliqués dans la régulation du signal au niveau pré-synaptique (Dudel et Kuffler, 1961). Ces récepteurs ont été mis en évidence par le fait qu'un signal excitateur précédé de 1 à 6 msec par un signal inhibiteur n'était pas propagé au neurone suivant.

Un grand nombre de récepteurs ont été décrits comme potentiellement pré-synaptiques (Khakh et Henderson, 2000). Ces récepteurs peuvent se situer aussi bien sur un neurone pré-synaptique relargant le neurotransmetteur qui peut les activer (autorécepteurs) que sur un neurone relargant un neurotransmetteur différent (hétérorécepteurs). Des récepteurs NMDA peuvent par exemple se situer sur l'axone de neurones noradrénergiques (Wang *et al.*, 1992).

Ces récepteurs montrent une grande variabilité quant à leurs localisations sur le neurone et leurs activations peuvent conduire aussi bien à une activation qu'à une inhibition du neurone post-synaptique. Les connaissances sur les récepteurs pré-synaptiques sont régulièrement complétées par de nouvelles études et une description détaillée de toutes les fonctionnalités de ces récepteurs serait de ce fait non-exhaustive. Une des constantes néanmoins admises porte sur un mécanisme d'activation des récepteurs qui serait identique quelle que soit la localisation pré-, post- ou extra-synaptique. Une molécule agissant sur un récepteur précis perturbe donc la voie de signalisation associée mais également dans une moindre mesure les autres voies.

V - Action *in vivo* de convulsivants et d'anticonvulsivants

V.A - Mécanismes d'action

Les propriétés pharmacologiques d'une molécule se définissent toujours par rapport à une cible, qui peut être dans cette étude un type de récepteur ou une voie de signalisation. Les deux principaux axes de caractérisation sont :

- L'activité, qui peut être identique (molécule agoniste) ou inhibée (molécule antagoniste).
- La fixation sur un récepteur, qui peut se produire sur le site de reconnaissance du ligand (molécule compétitive) ou ailleurs, y compris sur une cible différente (molécule non-compétitive).

V.B - Largeur de spectre d'action

Les molécules peuvent avoir un spectre d'action très restreint, avec par exemple comme cible un seul type de sous-unités uniquement quand celle-ci est associée précisément à d'autres sous-unités, ou bien large, en ciblant par exemple tous les récepteurs d'une même famille. La connaissance du spectre d'action d'une molécule est très importante pour mener une étude cohérente et fiable. Il est ainsi préférable, si aucune donnée n'est disponible, d'étudier l'action de molécules interagissant avec l'ensemble des récepteurs de cette voie plutôt que des molécules à spectre étroit.

Nos lignées de souris sur lesquelles nous avons travaillé ont été sélectionnées en fonction du temps de latence des convulsions après injection de MSO. Ce convulsivant est décrit comme agissant préférentiellement sur la voie glutamatergique (Eid *et al.*, 2008 ; Iles et Hamilton, 1976 ; Lamar et Sellinger, 1965 ; Subbalakshmi et Murthy, 1983). Plusieurs molécules doivent donc être utilisées pour cibler la voie glutamatergique afin d'étudier au mieux les différents types de récepteurs de cette voie. À l'inverse, des molécules avec un spectre large seront préférées pour les voies de neurotransmission autres que celle du glutamate.

V.C - Présentation des molécules testées

Outre la MSO, 5 autres molécules ont été testées sur les deux lignées de souris constituant notre modèle. Leurs formules chimiques sont présentées en figure 12.

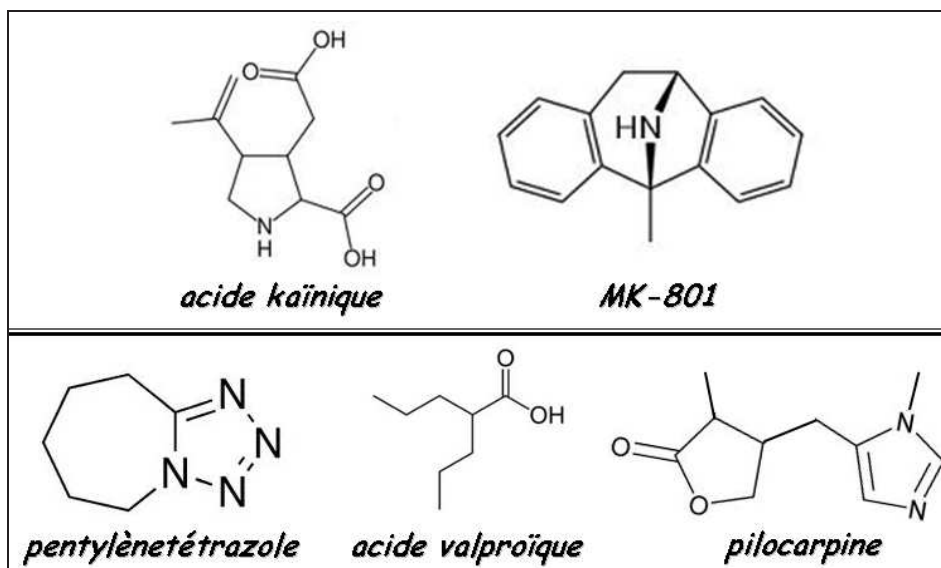


Figure 12 : Formules chimiques des convulsants et des anticonvulsivants utilisés

V.C.1 - L'acide kaïnique (KA)

Le KA est un agoniste total des récepteurs kaïnates, ainsi que des récepteurs AMPA quand ceux-ci sont associés à une protéine chaperonne de la famille des TARP (Nicoll *et al.*, 2006). Cette molécule se fixe sur les récepteurs au niveau du site de reconnaissance du glutamate dont elle est un analogue. À l'origine extraite de l'algue *Digenea simplex* (Kainin-sou en japonais), une augmentation importante du prix de l'algue dû à une pénurie a conduit à la mise au point d'une molécule de synthèse. Le KA issu de synthèse est celui utilisé comme convulsivant pour l'étude des souris.

V.C.2 - Le MK-801

Aussi appelée dizocilpine, cette molécule est un puissant antagoniste non-compétitif se fixant sur les récepteurs NMDA au niveau du domaine M2 (Kovacic et Somanathan, 2010). Cet antagoniste de synthèse rentre dans le pore et bloque l'influx de cations. Il faut donc que les récepteurs soient d'abord activés pour que le MK-801 puisse accéder au domaine de reconnaissance. Il s'agit d'une fixation voltage-dépendante au récepteur. L'efficacité du MK-801 varie en fonction des sous-unités composant le récepteur, impliquant une différence d'activité en fonction des zones cérébrales (Nankai *et al.*, 1998).

V.C.3 - Le pentylènetétrazole (PTZ)

Le mécanisme d'action de cet antagoniste non-compétitif de la voie GABAergique est encore mal connu. Il interagirait avec les récepteurs GABA_A entraînant ainsi un blocage du passage des ions chlorures. Ce blocage aurait également des répercussions directes sur l'expression des récepteurs GABA_B (Naseer *et al.*, 2010). Produit par synthèse chimique, il a longtemps été utilisé comme stimulant respiratoire et circulatoire mais sa capacité à provoquer des convulsions à des doses deux fois plus fortes a conduit à son retrait du marché. Le PTZ sert souvent de référence pour tester les propriétés anticonvulsivantes de molécules.

V.C.4 - L'acide valproïque (VPA)

Cette molécule de synthèse est un analogue de l'acide valérique. Elle est notamment utilisée pour ces propriétés antiépileptiques et antidépressives en raison de ses nombreuses cibles d'action. Le VPA bloque les canaux sodiques voltage-dépendants, les canaux calciques de type T mais il est considéré essentiellement comme un agoniste de la voie GABAergique en raison de son inhibition de la GABA transaminase (Chateauvieux *et al.*, 2010). Cette enzyme étant responsable de la dégradation du GABA, une inhibition conduit à une augmentation du taux de ce neurotransmetteur. Ainsi, contrairement aux deux précédentes molécules, le VPA ne se fixe pas directement sur les récepteurs impliqués dans la voie de signalisation GABAergique.

V.C.5 - La pilocarpine (PC)

Ce convulsivant est un alcaloïde agissant sur les récepteurs muscariniques (récepteurs cholinergiques métabotropes) et plus particulièrement des récepteurs M3. Cet agoniste compétitif est extrait des feuilles de *Pilocarpus pennatifolius* ou *Pilocarpus microphyllus*. Cette molécule est utilisée pour traiter différentes pathologies liées aux glandes sécrétoires et plus particulièrement les glandes salivaires et lacrymales. A fortes doses, la PC provoque des crises mimant l'épilepsie du lobe temporal, conduisant à une perte neuronale importante (Borges *et al.*, 2003).

VI - Implication de la neurotransmission dans les fonctionnalités cérébrales

Il existe pour chaque aspect comportemental des voies qui lui sont principalement associées, des voies considérées comme mineures mais rarement des voies entières de neurotransmission sont totalement exclues. En effet, il s'agit de situations plus ou moins complexes nécessitant une interaction des voies entre elles.

VI.A - L'étude comportementale

Des tests comportementaux ont été mis au point pour étudier au mieux chaque trait de caractère indépendamment des autres. L'étude de molécules pharmacoactives permet une assez grande liberté lors de la mise en place des protocoles, même si l'objectif détermine la majorité des paramètres. Ainsi une injection peut être réalisée par voie intra-péritonéale, intra-veineuse, intra-musculaire, intra-cérébrale, intra-nasale ou intra-oculaire. À l'inverse, l'étude comportementale nécessite des codes très précis à respecter pour chaque étude. Les animaux doivent parfois être préparés dès la naissance pour valider le test comportemental, comme l'étude de l'anxiété pour laquelle les animaux doivent être manipulés au minimum. C'est également pour cette raison que les tests concernant l'anxiété sont réalisés avant les tests d'apprentissage et de mémoire.

Peu de temps avant chaque test, un contrôle visuel doit être réalisé *a minima* pour s'assurer de la bonne santé des animaux, que les femelles ne soient pas gestantes ou bien que les souris aient eu un comportement social normal. Il est également fréquent de priver les souris de nourriture et parfois de boisson avant les tests d'apprentissage, la tâche d'apprentissage étant dans ce cas de trouver le plus rapidement la nourriture qui sert de récompense.

Les relations entre les voies de neurotransmissions et les aspects comportementaux doivent d'abord être référencées afin de choisir au mieux les comportements et les tests associés à utiliser.

VI.B - Les principales fonctionnalités

Chaque voie de neurotransmission possède ses propres propriétés pour l'excitation, l'inhibition, la localisation, conduisant ainsi à une implication différentielle dans les voies comportementales. Il est donc important de prendre en compte toutes les voies de neurotransmission pour analyser les traits comportementaux des animaux. La complexité est augmentée par le nombre de récepteurs différents présents dans chaque voie.

Les voies glutamatergique et GABAergique peuvent être étudiées par certains comportements, notamment l'anxiété et l'apprentissage. Ils couvrent en effet les deux principales voies de neurotransmission, ainsi que les voies muscarinique, sérotoninergique et dans une moindre mesure la voie dopaminergique. L'anxiété permet une étude de la voie sérotoninergique, de la voie GABAergique (Kalynchuk *et al.*, 2006 ; Prut et Belzung, 2003) et des récepteurs NMDA et mGluR pré-synaptiques appartenant à la voie glutamatergique (Duvoisin *et al.*, 2010 ; Hashimoto *et al.*, 2007 ; Nowak *et al.*, 1995).

Des troubles de l'anxiété et de l'humeur sont également associés fréquemment avec des crises épileptiques. L'apprentissage implique quant à lui principalement les voies muscariniques (Hamilton et Nathanson, 2001 ; Messer *et al.*, 1991) et les récepteurs glutamatergiques post-synaptiques (Perkinton *et al.*, 1999 ; Pláteník *et al.*, 2000 ; Simonyi *et al.*, 2005 ; Zilles *et al.*, 2000). Les récepteurs NMDA jouent un rôle dans l'apprentissage en raison de leur implication dans la neuroplasticité synaptique. La voie dopaminergique intervient indirectement dans l'apprentissage pour son rôle dans la recherche des récompenses (Kheirbek *et al.*, 2008).

VI.C - Les tests utilisés

Plusieurs tests peuvent servir à étudier le même comportement. La figure 13 présente les tests les plus utilisés pour l'étude de l'anxiété.



Figure 13 : Présentation des différents tests d'anxiété en fonction du type de réponse avec en jaune les tests de réponse non conditionnée et en rose les tests de réponse conditionnée (Belzung et Griebel, 2001 ; Rodgers *et al.*, 1997).

Les souris peuvent réaliser certains tests sans être influencées alors que d'autres tests nécessitent un stimulus extérieur tel que des décharges électriques. Les premiers tests induisent une réponse non conditionnée et les seconds une réponse conditionnée. Parmi ces nombreux tests, les plus utilisés sont les tests d'exploration induisant une réponse non conditionnée, et plus particulièrement le labyrinthe en croix surélevé et l'open field (Hogg, 1996 ; Prut et Belzung, 2003).

Les tests permettant l'étude de l'apprentissage et de la mémoire sont moins nombreux que ceux pour l'étude de l'anxiété mais les possibilités restent importantes. La figure 14 présente les principaux tests utilisés pour étudier l'apprentissage et la mémoire.

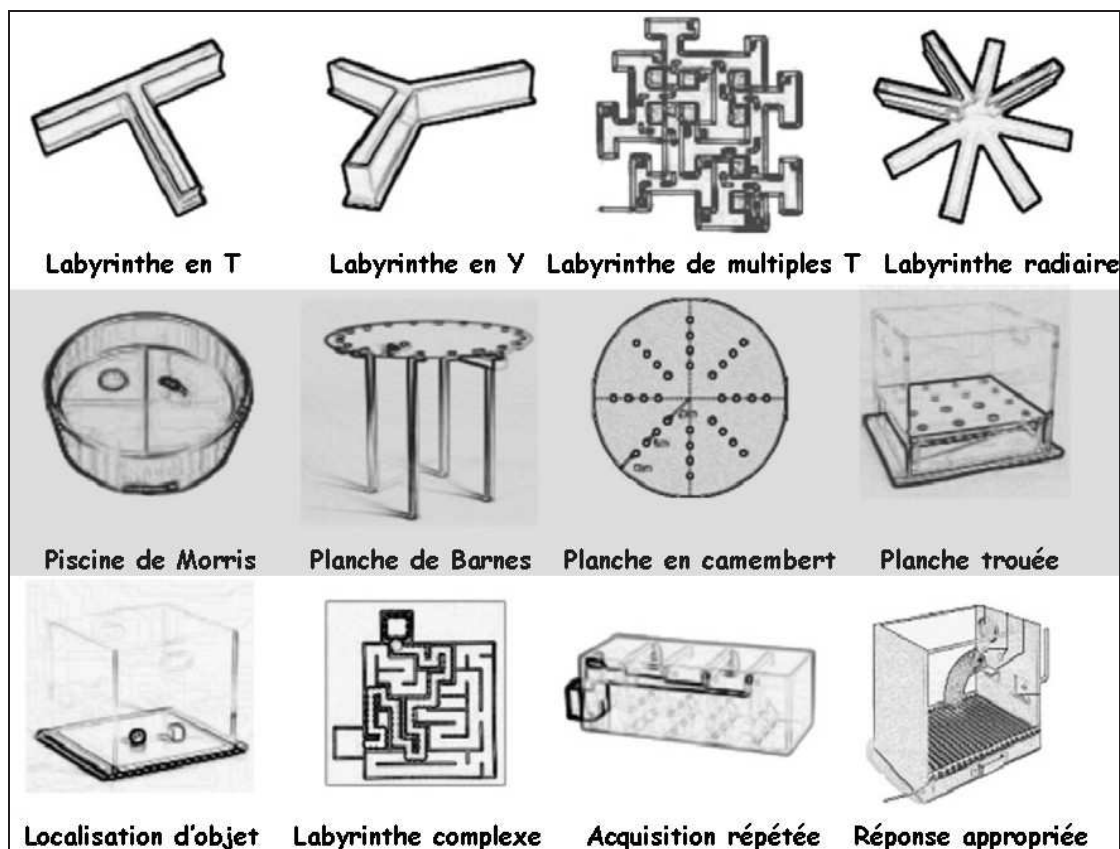


Figure 14 : Présentation des principaux appareillages permettant l'étude de l'apprentissage et de la mémoire (Sharma *et al.*, 2010).

Tous les tests mesurant l'apprentissage et la mémoire ne sont pas forcément adaptés pour la souris (Paul *et al.*, 2009) et les plus utilisés sont la piscine de Morris et le labyrinthe radiaire (D'Hooge et De Deyn, 2001 ; Schwegler et Crusio, 1995).

L'open field et le labyrinthe radiaire (figure 15) ont été choisis respectivement pour étudier l'anxiété et l'apprentissage afin de comparer les deux lignées, MSO-Slow et MSO-Fast. Ces deux tests présentent l'avantage d'être bien décrits dans la littérature. Les résultats peuvent être ainsi plus facilement comparés à ceux d'autres lignées de souris.

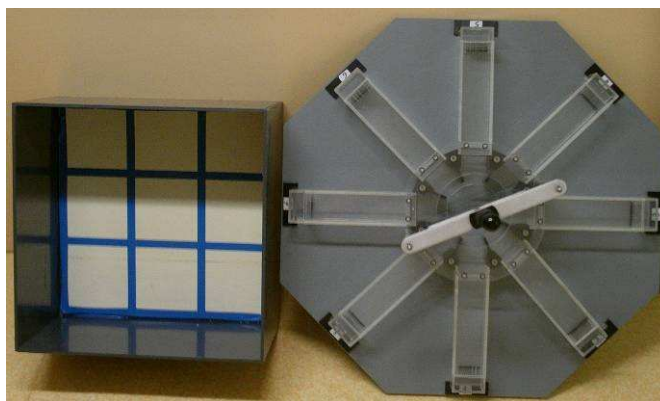


Figure 15 : Appareillages utilisés pour l'étude comportementale, l'open field et le labyrinthe radiaire situés respectivement à gauche et à droite de la photo

Matériel et méthodes

I - Les réactifs

L'origine des réactifs utilisés est présentée dans le tableau page 12.

II - Les animaux

Pour chaque expérimentation menée, les souris utilisées ont un niveau de sélection identique (présenté en introduction générale pages 26 à 29) entre les lignées MSO-Slow et MSO-Fast. Quel que soit le nombre de croisements consanguins dont sont issues les souris (entre 7 et 9), les souris sont considérées comme consanguines avec des caractères génétiques quasiment fixés. Les souris, mâles et femelles confondus, sont âgées de $76,9 \pm 8,5$ jours au moment de l'expérience.

Les souris sont élevées à une température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ avec une luminosité artificielle par néon de 7h30 à 19h30. L'eau et la nourriture sont accessibles *ad libitum*. Les expérimentations sont menées à la même lumière artificielle et à la même température que celle des box d'élevage.

Chaque étude a été menée de manière éthique en respectant la Directive du Conseil Européen du 24 novembre 1986 (86/609/ECC) avec l'autorisation du comité éthique local (agrément CREEA n°CL2007-023).

III - Étude de la latence à différents convulsivants et anti-convulsivants

III.A - Préparation de la MSO

La MSO est dissoute dans du sérum physiologique (solution 0,9% NaCl) à une concentration qui permet de garder le même rapport volume/poids quelle que soit la dose à injecter. Ainsi, pour une dose de 100mg/kg, la MSO est dissoute à une concentration de 10mg/ml et les autres concentrations de MSO seront réalisées proportionnellement (5mg/ml pour une dose de 50mg/kg, 20mg/ml pour une dose de 200mg/kg,...). Chacune des deux lignées possède une gamme spécifique de doses de MSO qui a été ajustée par rapport aux résultats obtenus (Cloix *et al.*, 2010b) et qui est présentée ci-dessous :

-MSO-Fast : 5 ; 10 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 75 et 100mg/kg

-MSO-Slow : 32,5 ; 65 ; 100 ; 150 ; 227,5 ; 260 ; 325 ; 350 ; 400 ; 500 et 600mg/kg

La cinétique de réponse à la MSO est réalisée à une dose unique de 75mg/kg pour les souris MSO-Fast ou 350mg/kg pour les souris MSO-Slow.

III.B - Préparation des convulsivants et anti-convulsivants

La MSO, le pentylènetétrazole (PTZ), l'acide kaïnique (KA), la pilocarpine (PC), l'acide valproïque (VPA) et le MK-801 sont d'abord dissouts dans du sérum physiologique. Les KA et VPA sont d'abord dissouts pour être deux fois concentrés, le pH est ajusté à 7,4 avec de la soude 3N puis le volume nécessaire de sérum physiologique est ajouté pour être à la concentration finale souhaitée.

L'effet des convulsivants et des anticonvulsivants a été étudié sur les deux lignées de souris après six croisements de sélection par la MSO (Cloix *et al.*, 2010b). Les doses utilisées pour la présente étude des lignées en fin de sélection sont donc identiques à celles ayant servi à la caractérisation précédente dont les résultats ont été publiés (Cloix *et al.*, 2010b), à savoir 75mg/kg pour le PTZ (Zhu *et al.*, 2007), 25mg/kg pour le KA (McKhann *et al.*, 2003), 250mg/kg pour le VPA (Applegate *et al.*, 1997) et 1mg/kg pour le MK-801 (Long *et al.*, 2006). La PC, non testée sur les générations précédentes, a été injectée à une dose permettant l'étude de la sensibilité des lignées (Müller *et al.*, 2009), soit 300mg/kg. La MSO, utilisée ici avec les anti-convulsivants, est injectée à une dose unique de 75mg/kg pour les souris MSO-Fast ou 350mg/kg pour les souris MSO-Slow.

III.C - Injection

Afin d'optimiser le nombre d'injections par jour et ainsi avoir une comparaison des résultats plus fiable, deux manipulateurs effectuent cette étape, l'un pesant les animaux et l'autre injectant le produit. Toutes les injections sont cependant réalisées par le même manipulateur. Les injections sont réalisées en intra-péritonéal entre 8h et 12h30 pour éviter au maximum l'effet du cycle circadien. Chaque étude a été effectuée sur 10 mâles et 10 femelles, excepté l'étude de la réponse à la MSO en fonction du temps pour laquelle 20 mâles et 20 femelles ont été observés. Le volume injecté correspond à 10µl par gramme de souris et l'utilisation de seringues de 500µl permet une précision au ½ gramme de souris près.

Des souris témoins sont utilisées pour l'étude des convulsivants et des anticonvulsivants. Elles sont injectées dans les mêmes conditions avec le sérum physiologique. Pour l'effet dose de la MSO, ce sont les souris injectées aux plus faibles doses qui servent de témoins, permettant ainsi de diminuer le nombre nécessaire de souris.

Les anticonvulsivants VPA et MK-801 sont administrés 30 minutes avant l'injection de MSO. L'effet propre convulsivant du MK-801 sur les 2 lignées de souris est étudié en injectant le composé 2 heures après la MSO ou le véhicule.

III.D - Détermination des temps de latence de convulsions

III.D.1 - L'échelle de Racine

Racine a décrit en 1972 (Racine, 1972) les différents signes pouvant apparaître lors d'une convulsion et a créé une échelle avec 6 stades basée sur l'ataxie (trouble de la coordination des mouvements) et la myoclonie (contraction brutale et involontaire des muscles). Cette échelle est aujourd'hui l'une des plus employée de par sa facilité d'utilisation.

- Stade 0 : pas de signe
- Stade 1 : ataxie, akinésie, myoclonie faciale, renflements répétés
- Stade 2 : myoclonie de la tête
- Stade 3 : myoclonie des membres antérieurs
- Stade 4 : myoclonie des membres postérieurs, flagellations de la queue, cabrage
- Stade 5 : convulsions généralisées

Cette échelle reste une référence mais certains signes peuvent disparaître, être modifiés ou apparaître en fonction du convulsivant utilisé. Ainsi la pilocarpine induit une sudation importante et le KA provoque une torsion latérale de 90° entre le haut et le bas du corps chez la souris.

III.D.2 - Observation des convulsions

La durée d'observation varie en fonction du composé étudié par rapport à la méthodologie mise en place par le laboratoire (Cloix *et al.*, 2010b). Les souris sont observées pendant une durée fixée à l'avance en fonction de la rapidité d'action précédemment décrite des différents produits. Ainsi les souris ont peu de chances de convulser 120 minutes après l'injection de KA (Cloix *et al.*, 2010b ; McKhann *et al.*, 2003) ou de PC (Müller *et al.*, 2009). Les premières convulsions induites par la MSO peuvent apparaître 12 heures après l'injection en fonction de la lignée, de l'individu et de la dose testés. Une observation de 600 minutes maximum a été choisie car elle permet de discriminer les souris lentes des souris rapides (Cloix *et al.*, 2010b) et l'observation peut être faite dans la journée sur un nombre important de souris, même avec une injection préalable d'un anticonvulsivant.

Le MK-801 est essentiellement utilisé comme antagoniste de la MSO mais il peut également induire des crises. Une durée d'observation de 60 minutes a ainsi été déterminée en fonction des premiers résultats de convulsions obtenus par le laboratoire pour les lignées de souris MSO-Slow et MSO-Fast. L'injection de PTZ induit des convulsions généralisées dont le temps de latence dépasse rarement les 3 minutes avec un fort taux de mortalité à 15 minutes (Chang et Myslinski, 1985 ; Homayoun *et al.*, 2002).

Le temps de latence observé correspond à la durée entre l'injection du convulsivant ou du véhicule et l'apparition de la première crise de stade 5 selon l'échelle de Racine, c'est-à-dire des convulsions généralisées. Toutes les observations sont réalisées par le même expérimentateur. Les souris sont au maximum 5 par cage pour limiter le phénomène d'entraînement, une souris pouvant convulser en effet plus facilement si une autre souris convulse à côté d'elle. Si la souris ne convulse pas pendant la période d'observation préalablement défini, le temps de latence attribué correspond alors à la durée d'observation, soit 600 minutes pour la MSO, 120 minutes pour la PC et le KA, 60 minutes pour le MK-801 et 180 secondes pour le PTZ.

L'effet de la MSO en fonction du temps est quant à lui observé par 2 expérimentateurs, l'apparition de certains stades étant difficile à définir. Chaque cage ne contient qu'une seule souris afin de faciliter l'observation.

IV - Étude des crises par électroencéphalogramme (EEG)

Un mâle et une femelle de chaque lignée, issues de fratries différentes, sont chacune implantées sous anesthésie à l'isoflurane 1,5% avec trois électrodes monopolaires de surface dans la boîte crânienne. Deux électrodes sont placées bilatéralement au niveau du cortex pariétal tandis que la troisième, servant pour la masse, est placée au niveau du cortex frontal. Les électrodes sont constituées d'un fil de tungstène de 250µm de diamètre surmonté d'un connecteur mâle (Wire-pro, Farnell). Elles sont insérées dans le crâne de manière à ce que la pointe (500µm) affleure le cerveau. Les électrodes sont enfin fixées sur le crâne avec du cyanoacrylate et du ciment dentaire.

Les EEG sont enregistrés 6 à 8 jours après l'implantation des électrodes sur des souris libres de leurs mouvements. L'enregistrement de l'activité encéphalique commence 30 minutes avant l'injection de MSO à 75mg/kg pour les souris MSO-Fast et 350 mg/kg pour les souris MSO-Slow, et se poursuit jusqu'à 8 heures après l'injection. Une observation en continu des souris permet d'enregistrer en parallèle les différents temps de latence aux convulsions généralisées. Les données sont traitées avec un enregistreur Powerlab 26T, model ML856 (ADInstruments) couplé au logiciel LabChart v7.

V - L'étude comportementale

V.A - L'anxiété

Vingt mâles et vingt femelles de chaque lignée sont soumis au test de l'open field selon un protocole similaire à ceux utilisés dans la plupart des études comportementales (Belzung et Griebel, 2001). Les souris doivent avoir été le moins possible manipulées pour obtenir des résultats les plus objectifs possibles. Le labyrinthe radiaire, test servant à mesurer l'apprentissage, est réalisé sur une semaine et implique une manipulation importante des animaux. L'open field doit donc être réalisé avant cet autre test pour ne pas biaiser les résultats.

La boîte utilisée pour l'open field a un fond clair sur lequel sont tracés 9 carrés, de 15cm de côté chacun, séparés par des lignes bleues de 2cm de largeur. Des parois sombres en plastique de 30cm de haut entourent les 9 cases. L'open field est placé au sol et toujours avec la même orientation. Le haut étant ouvert, chaque souris a la même vision de l'environnement, y compris de l'observateur qui occupe systématiquement la même place.

Le test commence dès que la souris est placée dans le carré central et dure 5 minutes. Quatre paramètres sont enregistrés :

- Le premier mouvement, correspondant au temps mis par la souris pour toucher une première fois une des lignes délimitant le carré central
- Le trajet, reporté sur un plan de la boîte préalablement imprimé. Il permet à la fin du test de déterminer le nombre total de carrés visités.
- Les lieux de défécation, reportés sur un plan de la boîte préalablement imprimé. Les fèces sont dénombrées à la fin du test.
- Les redressements, que la souris s'appuie ou non sur la paroi de l'open field

Au bout des 5 minutes, la souris est retirée et la boîte est entièrement rincée à l'éthanol 70% avec du papier absorbant car l'odeur laissée par la souris pourrait influencer sur le comportement de la souris suivante. Un biais serait alors créé et amplifié au cours de la journée. Ce rinçage est également réalisé avant la première souris et une attente d'au moins 5 minutes pour le séchage avant l'introduction de la souris suivante permet de tester toutes les souris dans les mêmes conditions.

V.B - L'apprentissage

Vingt mâles et 20 femelles de chaque lignée sont soumis au test du labyrinthe radiaire selon les bases du protocole utilisé par le laboratoire lors de précédentes études (Blin *et al.*, 2002).

Le labyrinthe est composé de huit bras (25cm de long, 6cm de largeur et 6cm de haut) relié entre eux par une partie centrale de 22cm de diamètre. Le labyrinthe est clos mais les souris peuvent voir à l'extérieur grâce aux parois en plexiglas transparent reposant sur un support gris foncé. Les entrées des bras peuvent être bloquées simultanément par des parois en plexiglas reliées entre elles par un système de guillotine. Les bras possèdent en leurs extrémités un mur de plexiglas d'une hauteur de 0,5cm permettant de cacher la récompense, un morceau de granulé pesant environ 10mg. La souris ne peut ainsi pas voir la récompense mais elle peut cependant la sentir. Chaque bras est numéroté et le labyrinthe a toujours la même orientation dans l'espace avec des objets identiques autour que la souris peut voir. Celui-ci est posé au sol pour ne pas créer d'anxiété due à la hauteur (Crusio *et al.*, 1993).

Les souris sont pesées au jour J0 et sont affamées pour qu'elles perdent 15% de leurs poids au premier jour du test (J1). Cette baisse de masse corporelle garantit que la souris essaiera de trouver un maximum de récompenses. Les souris sont réparties individuellement dans des cages et continuent à avoir accès à l'eau sans restriction. Une ration différente de nourriture est donnée chaque soir du test en fonction de chaque souris pour le maintien de leurs poids tout au long de l'expérimentation.

Les souris sont introduites au centre du labyrinthe, l'accès aux bras étant impossible. Le test commence dès que l'accès est rendu possible. Après chaque visite d'un bras, la souris est bloquée 10 secondes au centre du labyrinthe par la fermeture des bras pour ne pas que les animaux développent une stratégie kinesthésique, qui pourraient ainsi empêcher la nécessité d'apprentissage (Schwegler *et al.*, 1990). Pendant le test, 3 paramètres sont relevés :

- Le nombre d'erreurs. Une erreur est notée quand la souris rentre dans un bras sans prendre la nourriture ou si la nourriture a été prise lors d'une précédente visite de ce bras.
- Le nombre de premières entrées. Il s'agit du nombre de bras différents visités lors des 8 premières visites.
- Le nombre de défécations.

Un quatrième paramètre est enregistré à la fin du test. Il correspond au temps mis par la souris pour trouver les 8 récompenses. Pendant les 4 premiers jours, le test est arrêté au bout de 30 minutes si la souris n'a pas trouvé les 8 morceaux de nourriture et un score de 30 est donné au quatrième paramètre. Aucune limite de temps n'est imposée le dernier jour. Une fois le test terminé et la souris retirée du labyrinthe, les fèces et l'urine sont enlevés, mais pas l'odeur pour ne pas créer d'anxiété chez les souris.

VI - Traitement des résultats

Le logiciel GraphPad Prism a été utilisé pour déterminer l'effet dose de la MSO et le logiciel Statview a servi pour les analyses statistiques des données.

L'ED₅₀ de la MSO pour chacune des deux lignées est calculée avec une régression non-linéaire des données, des réponses normalisées et une pente variable.

Les résultats pour les latences aux différents convulsivants et anticonvulsivants ont été analysés par un test de Student (test *t*), excepté pour l'effet temps de la MSO pour lequel le test ANOVA (analyse de la variance) a été utilisé.

Ce test a également servi pour l'analyse des résultats comportementaux avec la lignée ou le sexe comme facteur de différence entre les individus et le jour comme facteur de différence pour chaque individu lors du test d'apprentissage. Les comparaisons pour chaque journée et des temps de latence aux convulsivants en fonction de la lignée et du sexe ont été réalisées avec des tests ANOVA à 2 paramètres.

Les valeurs présentées correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM) pour le nombre d'animaux testés. Les valeurs sont considérées comme significativement différentes avec un pourcentage d'erreur inférieur à 5% pour $p < 0,05$, inférieur à 1% pour $p < 0,01$ ou inférieur à 0,1% pour $p < 0,001$.

Résultats et discussion

I - Réponse à la MSO

I.A - Effet-doses de la MSO

Les résultats publiés sur les générations G6 apportent la preuve de la différence de sensibilité à la MSO entre les lignées MSO-Fast et MSO-Slow, les MSO-Fast ayant un temps de latence beaucoup plus court. Les deux lignées après 4 cycles de sélection complémentaires et la réalisation de 7 à 9 croisements consanguins ont donc été de nouveau testées pour étudier l'évolution de cette différence (figure 16).

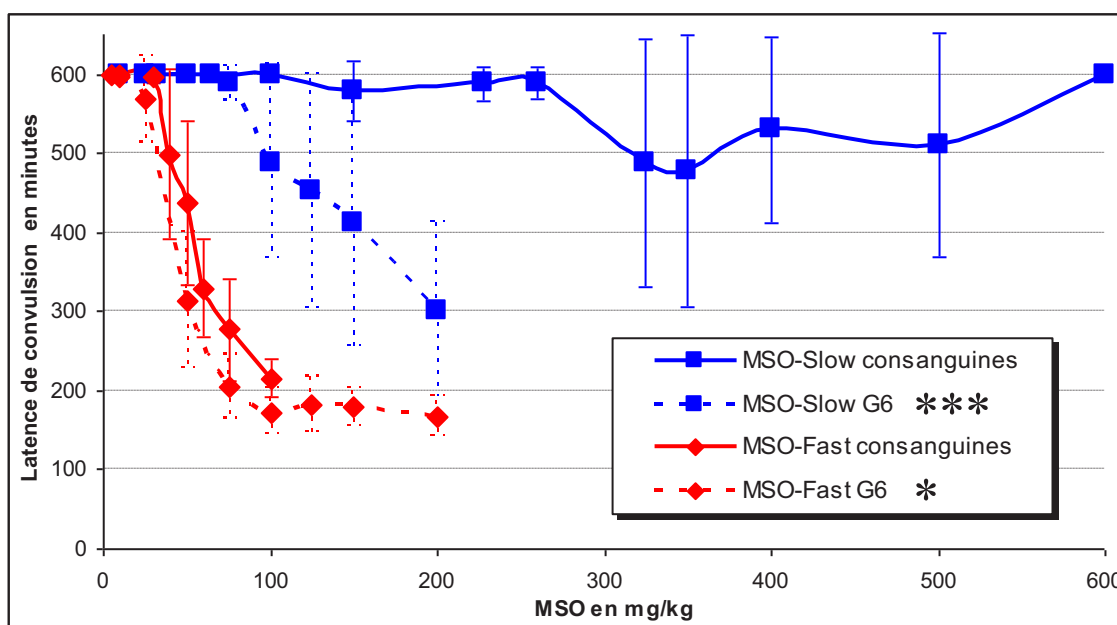


Figure 16 : Effet-doses de la MSO pour les lignées MSO-Slow et MSO-Fast consanguines sur les latences des convulsions généralisées. $n=20$, 10 mâles et 10 femelles \pm SEM. Comparaison par rapport aux résultats sur les lignées G6 (Cloix *et al.*, 2010b). Analyse par le test ANOVA, * : $p<0,05$, *** : $p<0,001$

Les souris consanguines MSO-Fast ont des temps de latence de convulsion en fonction de la dose de MSO légèrement plus élevés que les souris MSO-Fast de la génération G6. La différence de latence de convulsion entre les MSO-Fast et les MSO-Slow consanguines est plus marquée que chez les souris après 6 croisements de sélection. En effet, la latence de convulsion à 75mg/kg est de 600 minutes pour les MSO-Slow, aucune souris ne convulsant, et est de $277,6 \pm 64,5$ minutes pour les MSO-Fast.

Il est également intéressant de comparer les pourcentages de convulsion (figure 17) et de déterminer les ED_{50} correspondant à la dose pour laquelle 50% des souris convulsent.

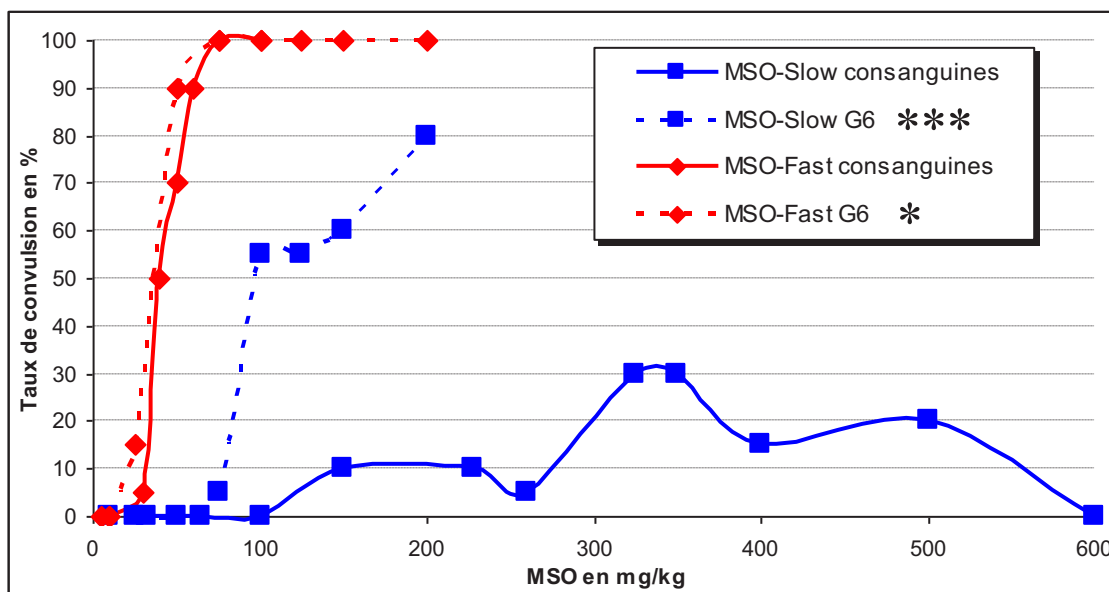


Figure 17 : Taux de convulsion pour les souris MSO-Slow et MSO-Fast en fonction de la dose de MSO injectée. n=20, 10 mâles et 10 femelles. Comparaison par rapport aux résultats sur les lignées G6 (Cloix *et al.*, 2010b). Analyse par le test ANOVA, * : $p < 0,05$, *** : $p < 0,001$

Les souris MSO-Fast consanguines et MSO-Fast G6 ont des ED_{50} respectivement de $41,8 \pm 1,6$ mg/kg et de $36,1 \pm 0,3$ mg/kg. Un ED_{50} de $124,9 \pm 10,3$ mg/kg a été calculé pour les MSO-Slow G6 mais ce calcul est impossible pour les souris MSO-Slow consanguines. Le taux maximal de convulsion de 30% est observé pour les doses de 325 et 350 mg/kg. La courbe indique qu'il n'y a que 5% de convulsion avec une dose de MSO de 125 mg/kg pour les souris consanguines, soit 10 fois moins que pour les MSO-Slow G6.

Le caractère de sensibilité des MSO-Fast consanguines a été quelque peu perdu par rapport aux souris G6, probablement au cours des croisements consanguins. Une absence de pression de sélection a pu conduire à une perte du caractère de sensibilité mais la perte est minimale (de 36,1 à 41,8 mg/kg) malgré les 7 à 9 croisements sans pression de sélection. Le choix de la lignée reste donc légitime pour la poursuite de l'étude. La sélection par la MSO pour les MSO-Slow sur les générations G6 à G9 a été très efficace, au point de supprimer le stade de la convulsion généralisée au minimum chez 70% des souris pour une dose de MSO donnée. L' ED_{50} n'est quant à lui plus calculable.

I.B - Etude de la mortalité et de la cécité chez les MSO-Slow

Au-delà de 350 mg/kg pour les MSO-Slow, le taux de convulsion diminue car le taux de mortalité devient plus important. Alors que les souris MSO-Fast convulsent ou survivent sans symptômes apparents quelle que soit la dose testée, les MSO-Slow peuvent, pour de très fortes doses, mourir ou présenter une forte opacité du cristallin. La répartition des souris MSO-Slow précédemment testées en fonction de leurs réponses est présentée en figure 18 pour certaines doses de MSO.

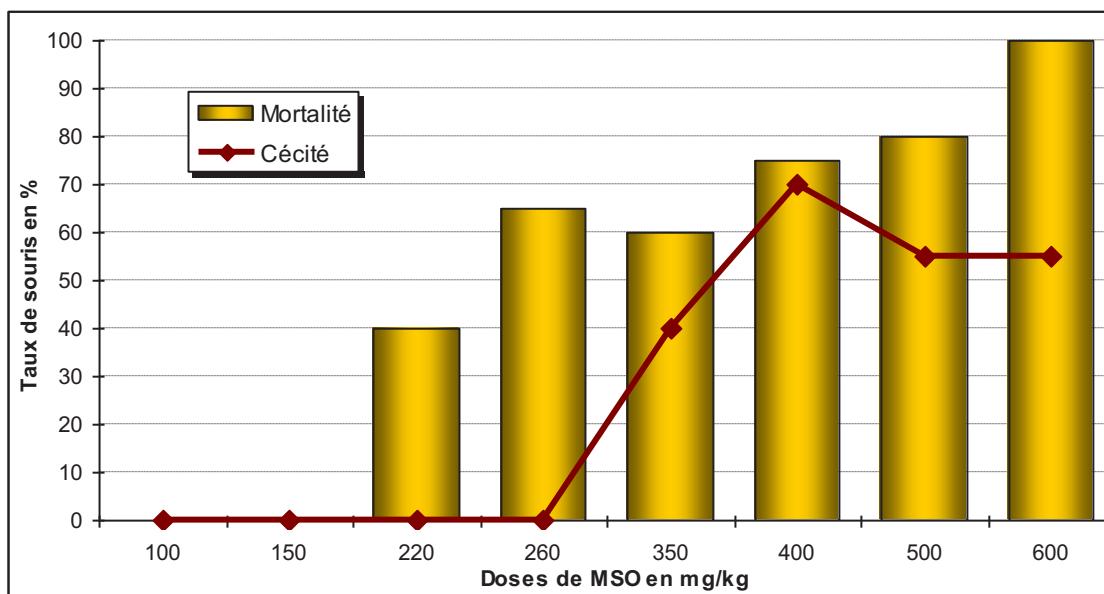


Figure 18 : Taux de mortalité et de cécité chez les souris MSO-Slow consanguines dans les 10 heures après l'injection de MSO. n=20, 10 mâles et 10 femelles.

Le nombre de souris survivant 10 heures après l'injection diminue avec l'augmentation de la dose. À partir de 350mg/kg, aucune souris ne survit sans cécité et plus aucune souris ne survit, même avec une cécité, à partir de 500mg/kg. La mortalité chez les MSO-Slow consanguines avant 10 heures apparaît à une dose 220mg/kg et augmente en fonction de la dose. Le maximum de convulsion est quant à lui de 30% et est atteint à une dose de 350mg/kg. Aucune souris ne convulse à 600mg/kg. Le nombre de souris souffrant de cécité varie selon la dose mais ce phénomène n'est présent que pour des doses supérieures ou égales à 350mg/kg. Aucune donnée concernant la cécité après convulsion n'est présentée ici car les souris sont sacrifiées immédiatement après la première convulsion.

La mortalité à des fortes doses de MSO pour les souris MSO-Slow peut avoir pour origine une hypothermie sévère. Bien qu'elle ne soit pas mesurée, cette conséquence physiologique a été précédemment décrite chez le rat (Ginefri-Gayet et Gayet, 1988) dont la température corporelle descendait au niveau de la température ambiante de la pièce après injection de fortes doses de MSO.

L'opacité du cristallin observée, quant à elle, peut s'expliquer par un effet direct de la MSO. En effet, ce convulsivant a comme cible d'action, outre la glutamine synthétase (Lamar et Sellinger, 1965 ; Ronzio *et al.*, 1969), l' α -glutamylcystéine synthétase (Orlowski et Wilk, 1975). Cette enzyme catalyse la réaction limitante dans la formation du glutathionne et une inhibition de cette enzyme peut conduire à l'apparition d'une cataracte (Mårtensson *et al.*, 1989). Ce phénomène n'étant observé qu'à des très fortes doses chez les souris MSO-Slow, il est fort probable qu'une quantité suffisante de MSO ait atteint les yeux des souris et provoqué une cataracte.

I.C - Latence d'apparition des différents stades de convulsion

La différence de latence de convulsion entre les souris MSO-Slow et MSO-Fast a été démontrée mais uniquement pour les convulsions généralisées correspondant au stade 5 de

l'échelle de Racine. Une étude de l'effet de la MSO en fonction du temps a donc été réalisée. Pour pouvoir observer les différents stades, des doses subconvulsivantes doivent être choisies pour s'assurer que toutes les souris atteindront les derniers stades. Les MSO-Fast reçoivent une dose de 75mg/kg de MSO mais l'absence de dose subconvulsivante pour les MSO-Slow nous conduit à utiliser la dose entraînant le plus fort taux de convulsion, c'est-à-dire 350mg/kg.

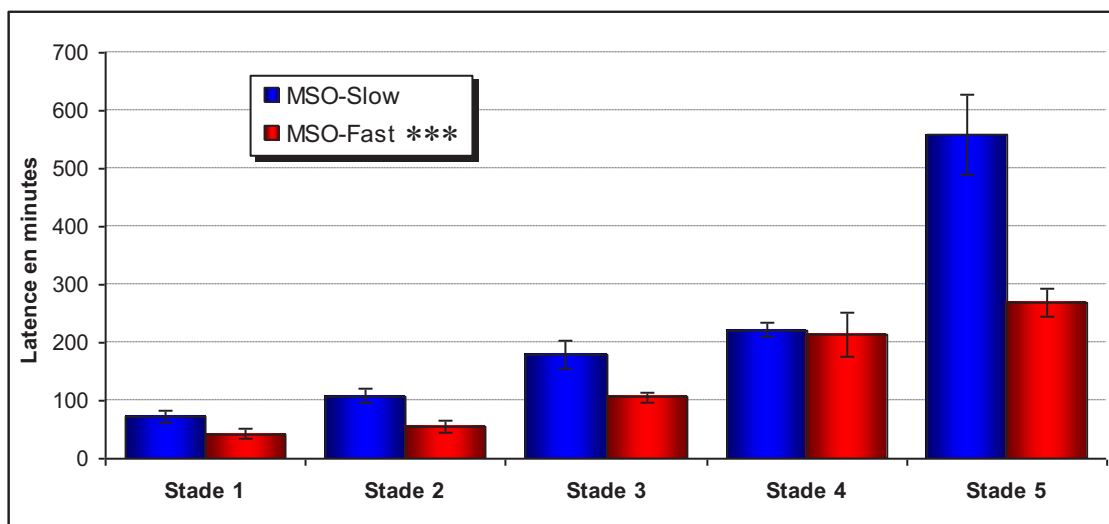


Figure 19 : Temps de latence pour l'apparition des différents stades de convulsion selon l'échelle de Racine. MSO-Slow injectés à 350mg/kg et MSO-Fast injectés à 75mg/kg. moyenne \pm SEM pour n=40, 20 mâles et 20 femelles. Analyse par le test ANOVA, *** : $p < 0,001$

La cinétique d'apparition des 5 stades entre les deux lignées consanguines MSO-Slow et MSO-Fast diffère avec une significativité inférieure à 0,001. Les souris MSO-Slow convulsent moins rapidement que les MSO-Fast pour les trois premiers stades et ont une latence identique pour le stade 4. L'absence de stade 5 chez la plupart des souris MSO-Slow entraîne une grande différence pour ce stade. Cette dernière donnée est en accord avec les résultats présentés pour l'effet-doses de la MSO. Il faut cependant une dose environ 5 fois supérieure aux MSO-Slow pour avoir des temps de latence d'apparition des stades proches de ceux des MSO-Fast.

1.D - Activité électroencéphalique

Les modifications de l'activité encéphalique sont enregistrées après injection de MSO (figure 20).

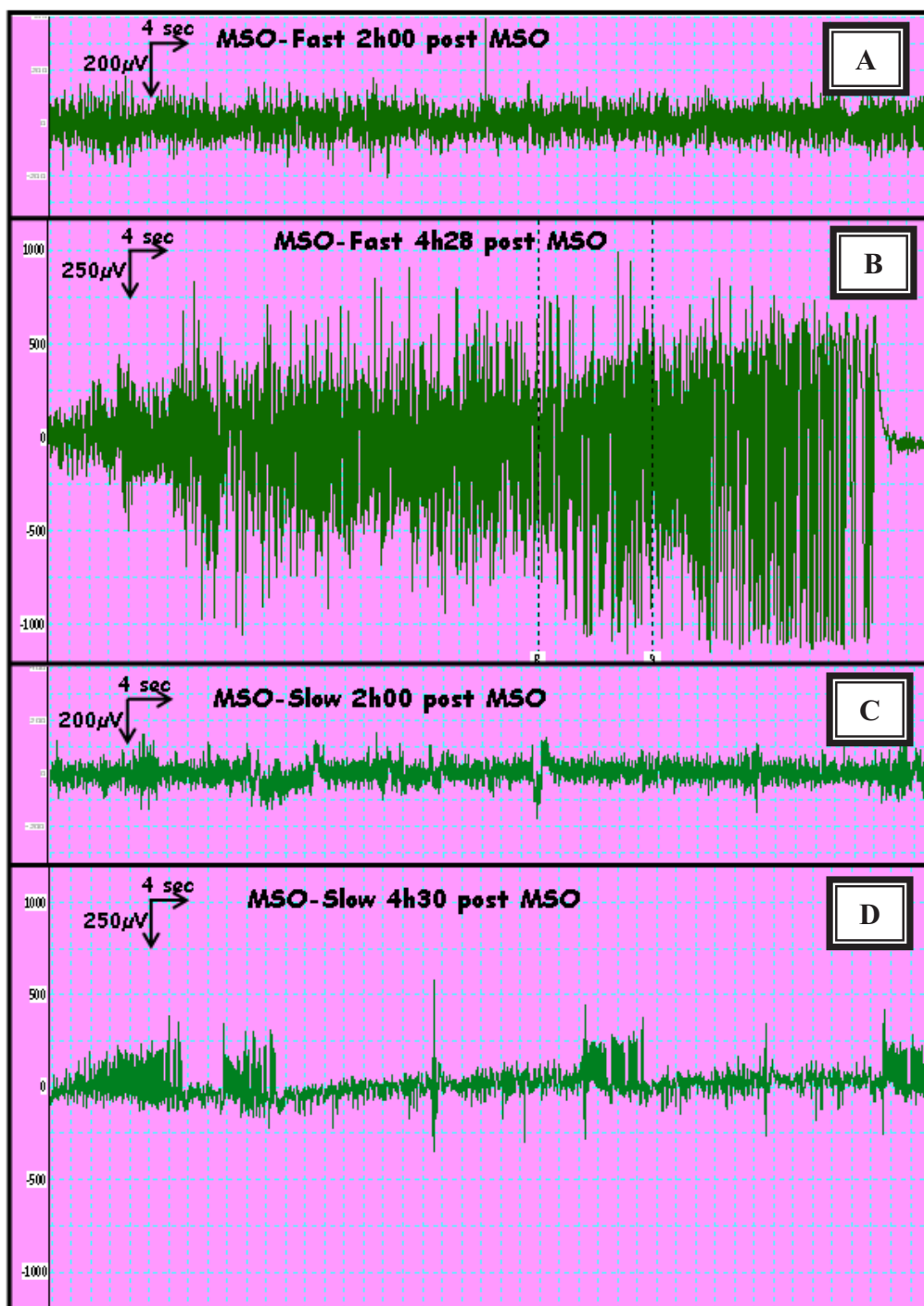


Figure 20 : EEG chez les MSO-Fast et les MSO-Slow après injection de MSO à 75mg/kg pour les MSO-Fast et 350mg/kg pour les MSO-Slow. A) MSO-Fast 2h après l'injection de MSO (stade 2). B) MSO-Fast 4h28 après l'injection de MSO (stade 5). C) MSO-Slow 2h après l'injection de MSO (stade 2). D) MSO-Slow 4h30 après l'injection de MSO (stade 4).

Les EEG en période pré-convulsive (figure 20A et 20C) ne sont pas différents entre les deux lignées. La MSO à 75mg/kg provoque chez les souris MSO-Fast des activités électroencéphalographiques longues et intenses (figure 20B), associées à des convulsions généralisées de stade 5. Les souris MSO-Slow ne présentent quant à elles que des anomalies brèves et de faibles intensités (figure 20D), même avec une dose de 350mg/kg. Ce profil électroencéphalographique est associé à un stade 4, c'est-à-dire une myoclonie des membres et/ou une flagellation de la queue.

I.E - Conclusion des études après injection de MSO

Les lignées MSO-Slow et MSO-Fast consanguines sont différentes l'une de l'autre pour la latence à la MSO, critère de sélection initial, et peuvent être utilisées dans le cadre d'une comparaison de l'effet de la MSO *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. La dose de MSO pour l'injection des MSO-Fast sera donc la même que précédemment, à savoir 75mg/kg. Les MSO-Slow devront quant à elles être injectées avec des doses différentes en fonction de l'objectif à atteindre.

La dose de 350mg/kg peut servir pour des études sur des durées courtes, c'est-à-dire inférieures à 6 heures. Cette dose entraîne en effet le taux maximal de convulsions parmi toutes les doses testées. De plus, les temps de latence d'apparition des différents stades de convulsion sont proches de ceux des MSO-Fast injectés à 75mg/kg.

Une dose de 200mg/kg sera en revanche privilégiée pour des études devant durer plus de 6 heures. Aucune dose n'étant subconvulsivante chez MSO-Slow pendant les 10 heures d'observation, celle de 200mg/kg apparaît comme un bon compromis. Toutes les souris atteignent en effet le stade IV sur l'échelle de racine à cette dose (stade précédant les convulsions généralisées) avec un fort taux de survie, contrairement aux souris injectées à 350mg/kg.

II - Effets de convulsivants et d'anticonvulsivants

II.A - Étude de trois convulsivants

Des souris de génération 6 de chaque lignée ont été testées avec différents convulsivants et anticonvulsivants et les résultats publiés démontrent une implication prédominante de la voie glutamatergique (Cloix *et al.*, 2010b). Les souris consanguines ont été testées de nouveau avec les mêmes doses de composés ainsi qu'avec de la pilocarpine, un convulsivant agissant sur la voie muscarinique, pour compléter cette étude (figure 21).

Aucune souris n'a convulsé au bout de 2 heures après injection de sérum physiologique, démontrant que les convulsions sont induites par les convulsivants et non par le stress de l'injection. Il n'y a pas de différence en fonction de la lignée pour la PC et le PTZ. Le PTZ, un antagoniste du récepteur GABA_A, et la PC, un agoniste de récepteur cholinergique muscarinique, induisent des convulsions chez les souris sans différence entre les deux lignées au niveau du taux et du temps de latence de convulsion. En accord avec les résultats précédents, la voie GABAergique n'est pas privilégiée pour l'explication de la différence de latence aux crises entre les deux lignées.

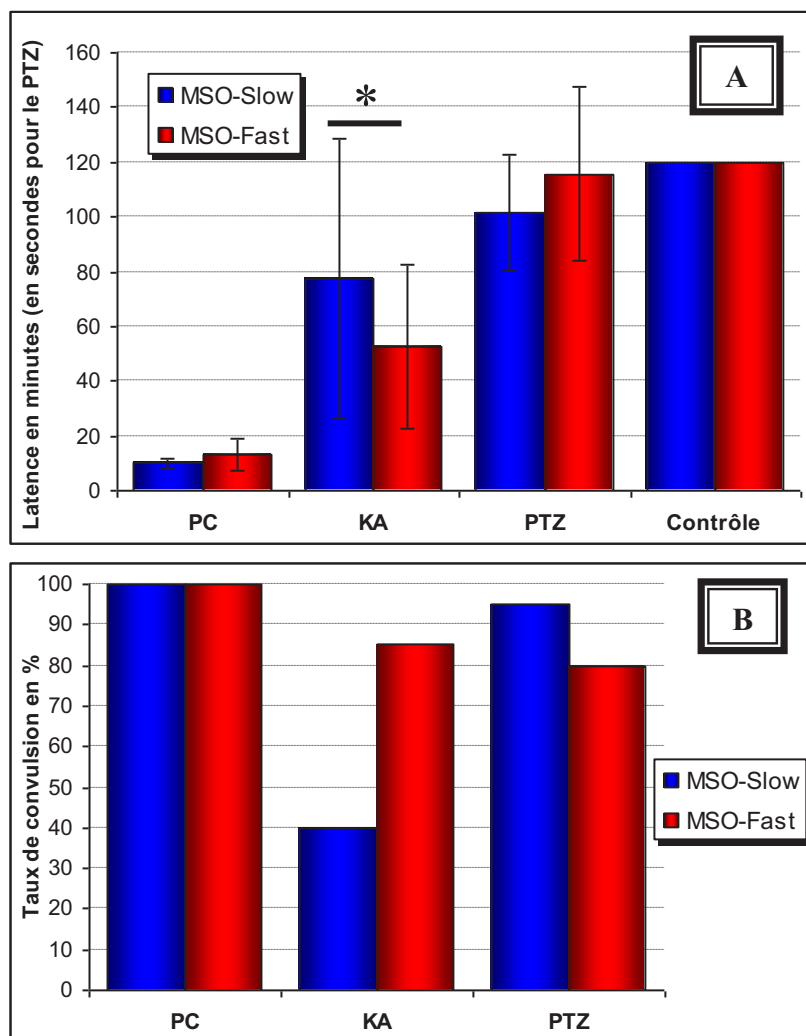


Figure 21 : Effet de 3 convulsivants.

PC : pilocarpine à 300mg/kg, KA : acide kaïnique à 25mg/kg, PTZ : pentylènetétrazole à 75mg/kg, Contrôle : sérum physiologique. n=20, 10 mâles et 10 femelles. Analyse par le test *t*, * : $p < 0,05$. A) Latence de convulsion en moyenne \pm SEM. B) Taux de convulsion.

Les souris sont très sensibles à la PC par rapport à d'autres lignées (Müller *et al.*, 2009 ; Winawer *et al.*, 2007). Cette sensibilité peut être due à une des lignées consanguines parentales ayant servi pour les croisements initiaux mais ne semble cependant pas impliquée dans les mécanismes de crises induites par la MSO, les deux lignées MSO-Slow et MSO-Fast ayant un temps de latence similaire.

Il est en revanche difficile de conclure sur les temps de latence au KA même si ceux-ci sont différents ($p < 0,05$) car les taux de convulsions sont eux très différents en fonction de la lignée comme le montre la figure 21.

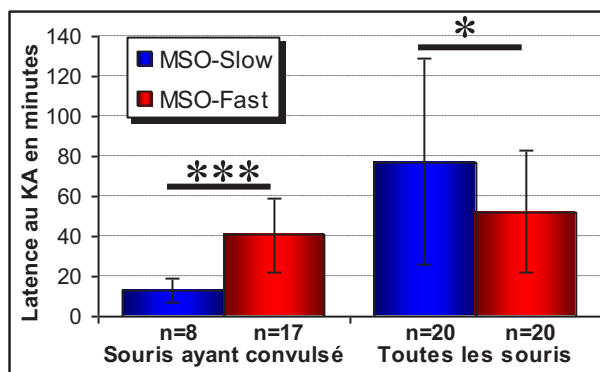


Figure 22 : Latence au KA.

Analyse par le test *t*, * : $p < 0,05$, *** : $p < 0,001$.

Les MSO-Fast ont une population dans laquelle 85% des souris convulsent après injection de KA, avec une latence comprise entre 3 et 116 minutes. À l'inverse, deux populations peuvent être distinguées chez les souris MSO-Slow. La première population, constituée de 60% des souris, ne convulse pas à la dose de 25mg/kg pendant le temps d'observation alors que la seconde population est constituée des souris possédant un temps de latence entre 5 et 29 minutes. En comparant les souris ayant convulsé pour les deux lignées (figure 22), le temps de latence est de $13,5 \pm 6,0$ minutes pour les MSO-Slow et de $38,1 \pm 3,6$ minutes pour les MSO-Fast. Ces temps de latence sont différents ($p < 0,001$).

La différence de réponse au KA entre les deux lignées se traduit dans les taux de convulsions et dans les temps de latence des souris ayant convulsés. L'étude de la consanguinité par la MSO a montré une légère dérive enregistrée pour les MSO-Fast et une forte augmentation de la résistance chez les MSO-Slow. Le comportement des souris vis-à-vis du KA peut être mis en parallèle avec les résultats concernant la latence à la MSO. Les MSO-Fast ont un temps de latence identique ($52,5 \pm 30,0$ minutes pour les consanguines et $46,7 \pm 23,2$ minutes pour la génération 6). À l'inverse, une évolution a été enregistrée pour les MSO-Slow consanguines. Celles-ci sont plus résistantes au KA que les souris de la génération 6, avec respectivement des taux de convulsions de 40% et 65%. La réponse au KA des deux lignées confirme la voie glutamatergique comme celle probablement ciblée par la MSO.

Une des deux hypothèses est que la MSO utilise les récepteurs kaïnates pour agir, soit en se fixant exclusivement sur ces récepteurs, soit en se fixant sur plusieurs types de récepteurs glutamatergiques dont les récepteurs kaïnates. La deuxième consiste en la fixation de la MSO sur un autre type de récepteur glutamatergique, (AMPA, NMDA ou métabotrope) mais avec une cible d'action intracellulaire commune avec le KA. La différence de latence pour les souris convulsant au KA, et le fait que dans ce cas les MSO-Slow soient plus rapides que les MSO-Fast, pourrait s'expliquer par un mécanisme d'apparition des crises qui soit différent entre les MSO-Fast et les MSO-Slow consanguines plutôt qu'une hétérogénéité de la lignée MSO-Slow. En effet, les souris convulsant sous KA appartiennent à différentes fratries et ont par conséquent les mêmes parents que celles sans convulsions généralisées.

II.B - Action de deux anticonvulsivants

L'injection d'anticonvulsivants avant l'injection de MSO a été réalisée dans le but de compléter cette étude et d'apporter des éléments permettant de mieux comprendre le mécanisme de la MSO (figure 23).

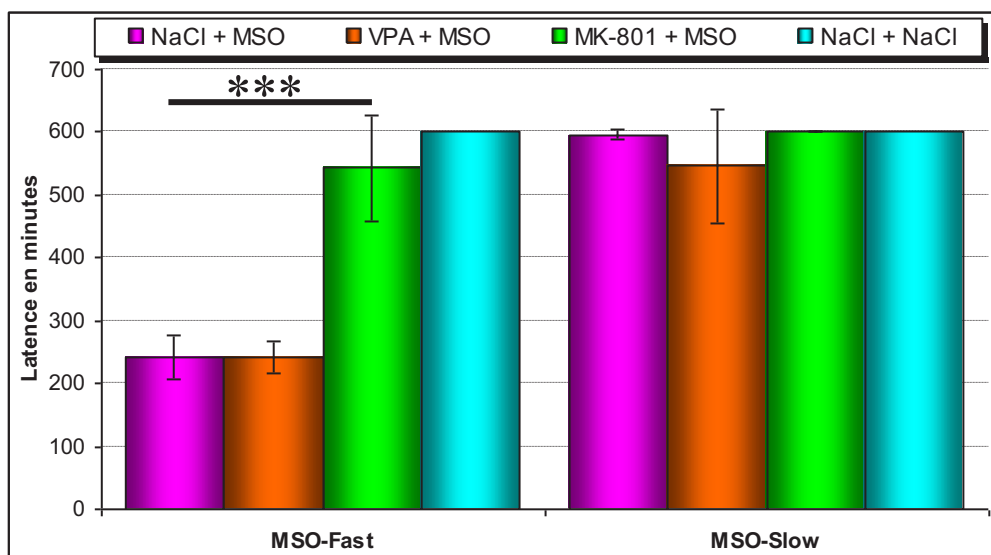


Figure 23 : Temps de latence à la MSO après injection d'anticonvulsivants

Acide valproïque (VPA) à 250mg/kg et MK-801 à 1mg/kg. Anticonvulsivants injectés 30 minutes avant la MSO à 75mg/kg pour les MSO-Fast ou 350mg/kg pour les MSO-Slow. Témoins : sérum physiologique (NaCl) injecté 30 minutes avant la MSO et double injection de sérum physiologique à 30 minutes d'intervalle (NaCl + NaCl). moyenne \pm SEM pour n=20, 10 mâles et 10 femelles. Analyse par le test *t*, *** : $p < 0,001$.

Le VPA n'induit pas de modification du temps de latence quelle que soit la lignée testée. Il s'agit d'un agoniste de la voie GABAergique par inhibition de la dégradation du GABA (Chateauvieux *et al.*, 2011) mais agit également dans une moindre mesure sur les canaux ioniques voltage dépendant (VanDongen *et al.*, 1986). Le VPA provoque une augmentation de la quantité de GABA pour une action sur tous les récepteurs GABAergiques, qu'ils soient ionotropes ou métabotropes. La voie GABAergique est donc étudiée dans son ensemble et l'absence de différence entre les lignées pour le VPA peut être mise en parallèle avec les résultats obtenus avec le PTZ. La voie GABAergique a donc un rôle inexistant ou très faible dans la différence de sensibilité à la MSO de notre modèle murin.

Alors que le MK-801, un antagoniste des récepteurs glutamatergiques NMDA (Kornhuber *et al.*, 1989) augmente la latence à la MSO chez les souris MSO-Fast consanguines, l'effet chez les MSO-Slow est difficilement observable directement car cette lignée convulse peu sous MSO (figure 17). Il est donc intéressant, notamment pour les souris MSO-Slow, de comparer les répartitions des souris testées 10 heures après l'injection de MSO en fonction de leurs réponses à la MSO (figure 24).

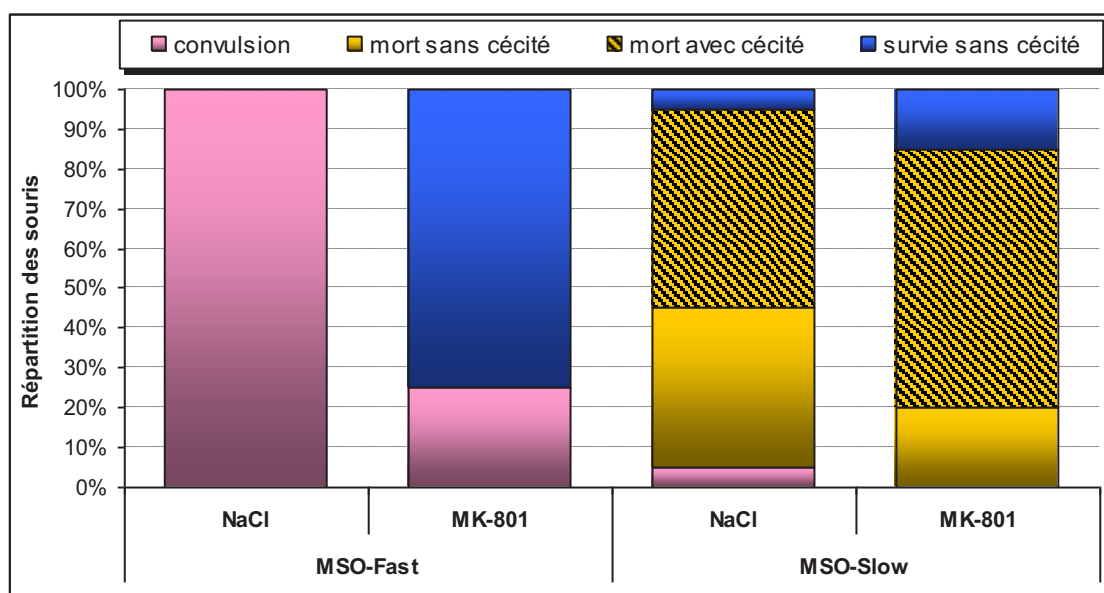


Figure 24 : État des souris 10 heures après l'injection de la MSO à 75mg/kg pour les MSO-Fast ou 350mg/kg pour les MSO-Slow. Les souris reçoivent une injection de MK-801 à 1mg/kg ou de sérum physiologique 30 minutes avant l'injection de MSO.

Le MK-801 entraîne ainsi une diminution de 75% du nombre de souris MSO-Fast ayant convulsés. Les MSO-Fast n'ayant pas développé de convulsions généralisées survivent sans présenter de cataracte. Le taux d'apparition de la cataracte et le taux de survie varient quant à eux chez les MSO-Slow consanguines pendant l'observation de 10 heures en fonction des conditions expérimentales. Ces taux sont supérieurs chez les MSO-Slow précédemment injectées au MK-801 par rapport aux MSO-Slow injectées au sérum physiologique puis MSO.

Alors que les souris MSO-Fast consanguines étaient très proches des MSO-Fast de génération 6 pour l'effet de la MSO et des convulsivants, il semblerait que le MK-801 soit moins protecteur pour les souris consanguines. Aucune convulsion n'était observée chez les souris MSO-Fast de génération 6 préalablement injectées avec du MK-801 alors que 25% des souris MSO-Fast consanguines convulsent avec un temps de latence de $374,2 \pm 15$ minutes. Un effet protecteur est également observé chez ces souris ayant des convulsions, le temps de latence étant augmenté de 55% par rapport aux souris injectées uniquement avec de la MSO. La poursuite de la sélection des MSO-Fast a donc conduit à une modification de la cible du MK-801 pour cette lignée, la rendant moins sensible à l'effet anticonvulsivant du MK-801.

Même si cet effet du MK-801 est difficile à mettre en évidence chez les MSO-Slow consanguines à cause du faible pourcentage de convulsion, l'absence de souris convulsant parallèlement à une augmentation de la survie met en évidence le rôle antagoniste du MK-801 pour cette lignée. Le MK-801 induit également une augmentation du nombre de souris avec la cataracte chez les MSO-Slow. Ceci confirme que le mécanisme d'action de la MSO provoquant les crises et celui provoquant la cataracte sont très probablement différents et que cet effet secondaire est dû uniquement à une dose très élevée de MSO injectée. Le MK-801 ayant un effet antagoniste de la MSO, il est donc fort probable que ces deux composés aient une cible d'action commune.

II.C - Le MK-801 comme convulsivant

Lors du test des anticonvulsivants, des crises ont été rapidement observées après l'injection de MK-801, c'est-à-dire avant l'injection de MSO ou très peu de temps après (0 à 15 minutes), ce qui démontre que l'effet du MK-801 est double : anticonvulsivant et convulsivant. Il est fort probable que ces deux effets soient médiés par les récepteurs NMDA. L'effet convulsivant du MK-801 a donc été testé et la MSO a été choisi comme anticonvulsivant en raison de l'effet antagoniste mesuré lors de l'observation précédente.

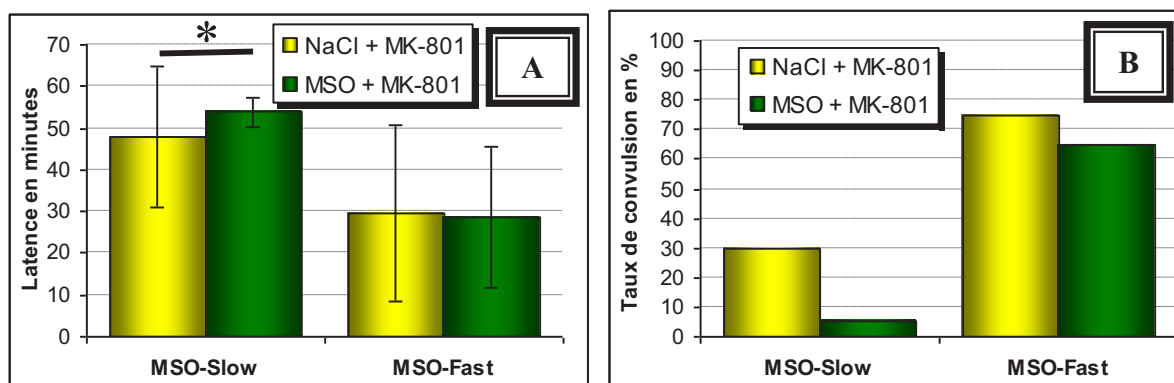


Figure 25 : Effet convulsivant du MK-801

à 1mg/kg 2 heures après une injection de sérum physiologique (NaCl + MK-801) ou de MSO à 350 mg/kg pour les MSO-Slow et 75mg/kg pour les MSO-Fast (MSO + MK-801). Observation pendant 60 minutes après l'injection de MK-801. n=20, 10 mâles et 10 femelles. Analyse par le test *t*, * : $p < 0,05$. A) Latence de convulsion, moyenne \pm SEM. B) Taux de convulsion.

L'injection de MSO ne prévient pas l'apparition des crises induites par le MK-801 chez les seules MSO-Fast consanguines, le taux de convulsion étant similaire (figure 25). Les temps de latence, $29,6 \pm 21,2$ minutes pour l'effet de la MSO et $28,6 \pm 17,1$ minutes pour le contrôle, ne sont pas différents. La MSO a en revanche un effet protecteur pour les MSO-Slow, le pourcentage de convulsion diminuant de 25% par rapport au contrôle. La différence significative de latence entre l'injection de sérum physiologique et celle de MSO pour les MSO-Slow, respectivement de $47,9 \pm 16,9$ minutes et de $53,9 \pm 3,5$ minutes.

Une injection de la MSO suivie d'une injection de MK-801 met en évidence un rôle antagoniste de la MSO dans cette expérience pour les MSO-Slow. La MSO et le MK-801 agissent donc sur la même voie car le MK-801 antagonise également les convulsions induites par la MSO. Aucune conclusion ne peut en revanche être faite sur l'utilisation par la MSO de la voie de signalisation glutamatergique.

Le MK-801 a en revanche un effet plus fort pour les MSO-Fast, la MSO n'induisant qu'une baisse sensible du taux de convulsion. Ainsi, pour cette lignée, la MSO et le MK-801 ont des effets antagonistes entre eux plus faibles qu'attendus. D'une part les souris consanguines sont moins sensibles à l'injection de MK-801 comme anticonvulsivant que les souris G6. D'autre part la MSO n'a pas montré d'effet anticonvulsivant lors du test d'inhibition du MK-801. Cela indiquerait que la sensibilité des souris MSO-Fast à la MSO ne passe pas directement par la fixation du convulsivant aux récepteurs glutamatergiques NMDA dont le MK-801 est spécifique.

III - Etude comportementale

L'utilisation de tests comportementaux permet ainsi de mettre en évidence un dysfonctionnement éventuel de l'une des voies à laquelle est reliée la fonction testée.

III.A - L'anxiété

Les résultats pour les différents paramètres permettant de mesurer l'anxiété se situent en figure 26.

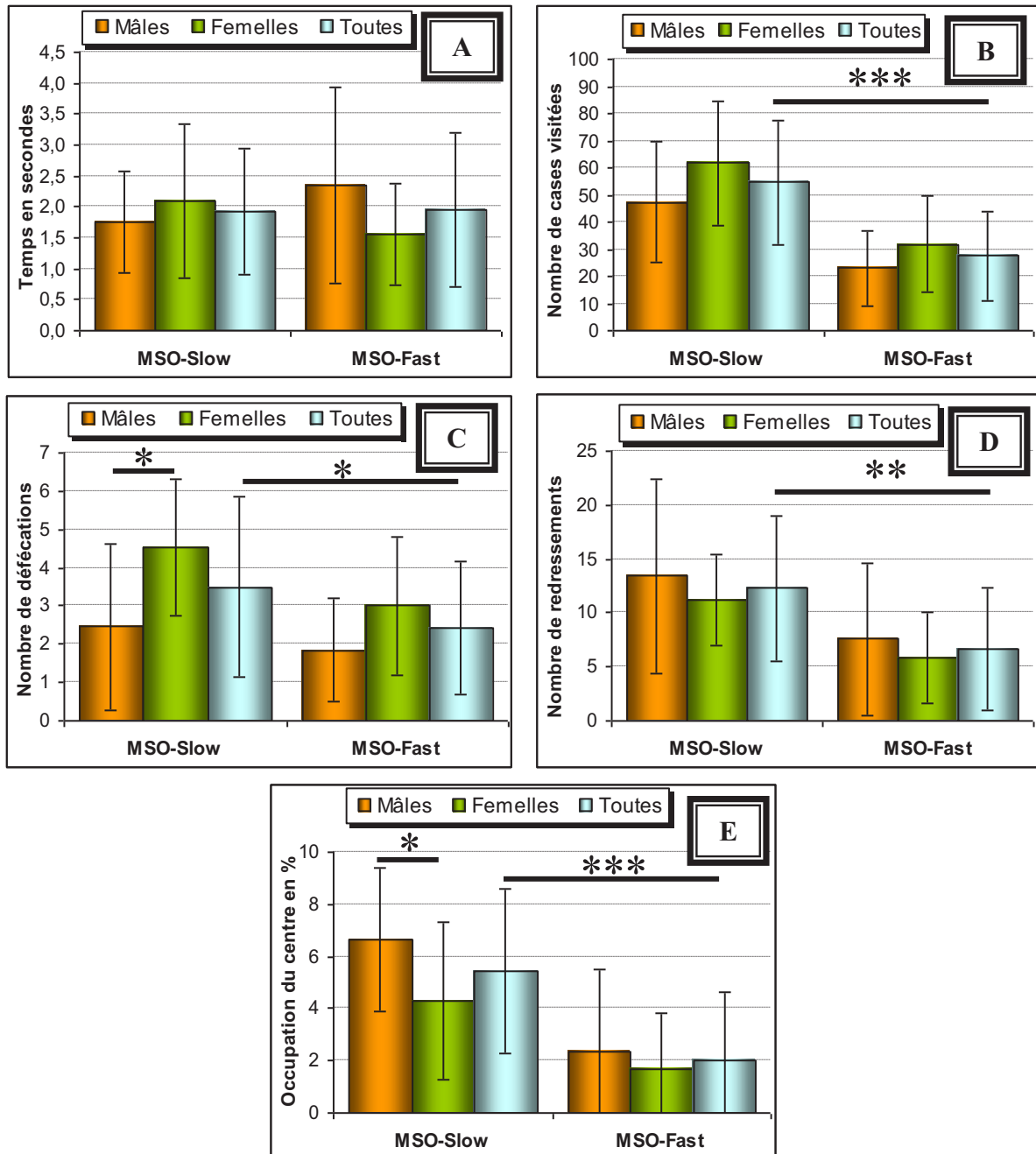


Figure 26 : Résultats pour les différents aspects de l'open field. n=40, 20 mâles et 20 femelles. moyenne \pm SEM. Analyse par le test ANOVA, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$. A) Temps mis pour le premier franchissement de ligne. B) Déplacement. C) Propreté. D) Curiosité. E) Occupation du centre de l'open field retour dans la case centrale par rapport aux déplacements totaux.

Après analyse des résultats par ANOVA, aucune différence significative n'est enregistrée concernant le temps mis pour effectuer le premier déplacement (LIGNÉE : $p=0,944$; SEXE : $p=0,525$; LIGNÉE X SEXE : $p=0,107$).

Les 4 autres paramètres mesurant l'anxiété révèlent quant à eux une différence entre MSO-Slow et MSO-Fast. Ainsi les MSO-Fast apparaissent plus anxieuses :

- dans leurs déplacements (LIGNÉE : $p<0,001$; SEXE : $p=0,035$; LIGNÉE X SEXE : $p=0,617$)
- pour la curiosité (LIGNÉE : $p=0,003$; SEXE : $p=0,271$; LIGNÉE X SEXE : $p=0,878$)
- pour la défécation (LIGNÉE : $p=0,048$; SEXE : $p=0,003$; LIGNÉE X SEXE : $p=0,378$)
- pour le retour au centre de l'open field (LIGNÉE : $p<0,001$; SEXE : $p=0,063$; LIGNÉE X SEXE : $p=0,298$)

Le dernier paramètre, SEXE, nous indique qu'il pourrait y avoir un effet du sexe dans les résultats obtenus pour les défécations, les déplacements et le retour au centre de l'open field. Seules les MSO-Slow présentent une différence mâle/femelle. Ces dernières sont plus anxieuses car elles retournent plus difficilement au centre ($p=0,045$) et produisent plus de défécations ($p=0,020$). L'écart enregistré entre les mâles et les femelles pour les déplacements n'est pas significatif ni pour les MSO-Slow ($p=0,117$), ni pour les MSO-Fast ($p=0,150$).

III.B - L'apprentissage

Ce trait comportemental est le principal qui soit évalué dans le test du labyrinthe radiaire. Les deux premiers jours de tests sont considérés comme de l'habituation. Aussi, seul les résultats obtenus pour les jours J3 à J5 sont présentés dans la figure 27 et analysés statistiquement.

La défécation sert de témoin d'anxiété dans ce test. L'absence de différence pour ce paramètre entre les lignées montre que les deux premiers jours ont servi d'habituation pour les MSO-Fast et que l'anxiété a été en grande partie supprimée. Les résultats présentés ne sont donc pas faussés par de l'anxiété.

Pour ce test d'apprentissage, il n'y a aucune différence significative entre les souris MSO-Slow et les souris MSO-Fast. Toutes les évolutions en fonction du temps sont identiques entre les deux lignées. Les seules différences significatives ont été observées entre les femelles et les mâles d'une même lignée. L'activité des mâles MSO-Slow augmente en fonction du nombre de tests effectués alors que les femelles ont une activité constante ($p=0,008$). Les femelles MSO-Fast font moins d'erreurs parmi les premières entrées ($p=0,022$) mais sont plus anxieuses que les mâles car leur nombre de défécations est plus important ($p=0,006$). Ce nombre diminue en fonction du nombre de tests pour les femelles alors qu'il est constant pour les mâles ($p=0,016$).

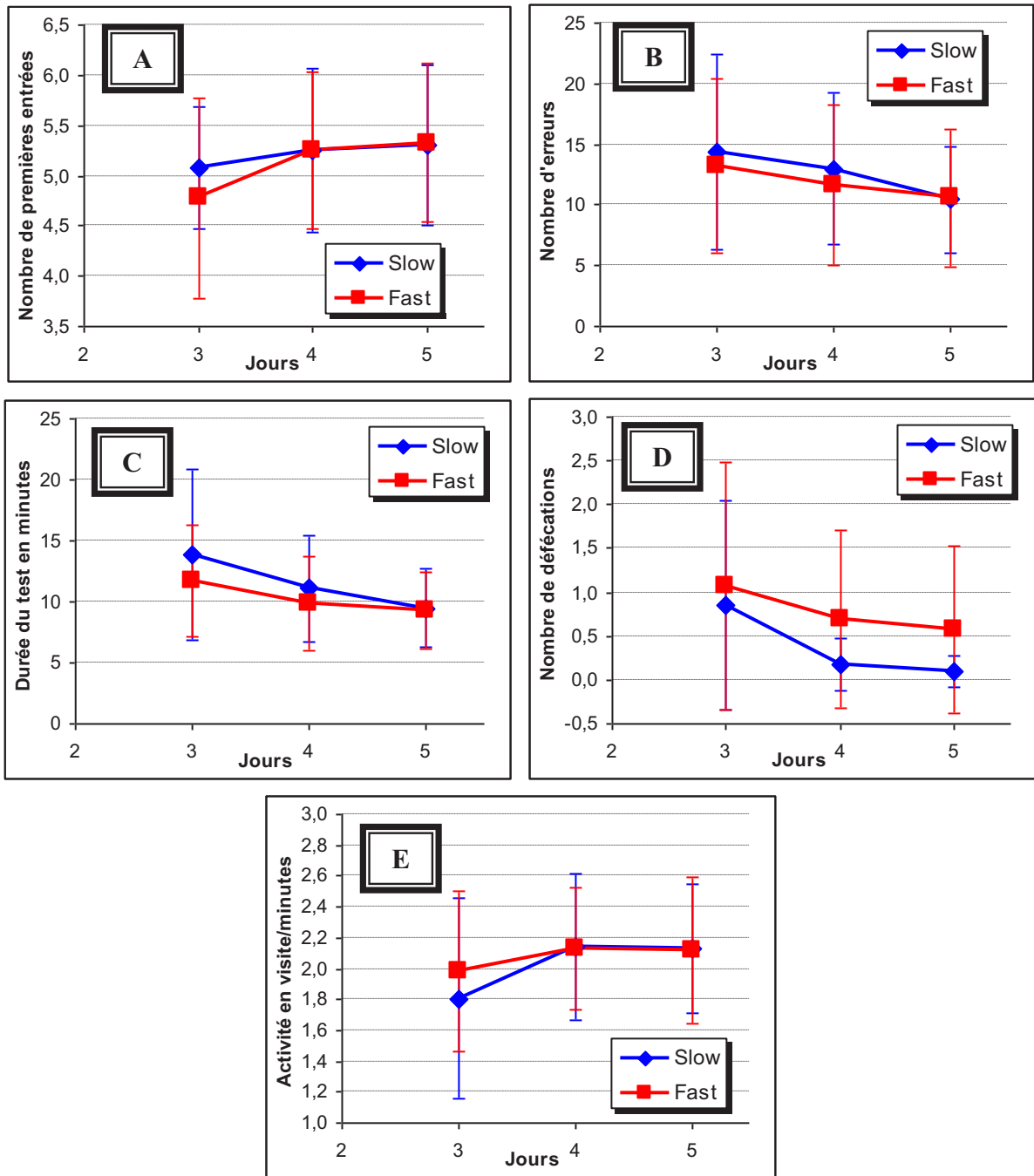


Figure 27 : Évolution de l'apprentissage des souris pour les jours J3 à J5.

n=40, 20 mâles et 20 femelles, moyennes \pm SEM. Analyse par le test ANOVA, A) Premières entrées, correspondant au nombre de bras corrects visités lors des 8 premières entrées. B) Nombre d'erreurs, soit le nombre de bras visités sans prendre la récompense ou pour lesquels la récompense a déjà été prise. C) Temps mis par la souris pour trouver les 8 récompenses. Pour les seuls J3 et J4, le test est arrêté au bout de 30 minutes si la souris n'a pas trouvé toutes les récompenses. D) Défécations des souris. E) Activité des souris pendant le test, correspondant au nombre de bras visités (corrects ou erronés) par minute.

III.C - Les voies de signalisations mises en évidence

Les deux tests comportementaux utilisés permettent d'étudier 4 des principales voies de neurotransmissions : glutamatergique, muscarinique, GABAergique et sérotoninergique. Seul l'open field a permis d'établir une différence d'anxiété entre les deux lignées de souris en niveau basal, c'est-à-dire sans injection de convulsivants.

Les récepteurs muscariniques sont impliqués dans l'apprentissage (Hamilton et Nathanson, 2001 ; Messer *et al.*, 1991). Cependant, aucune différence n'a été enregistrée entre les deux lignées MSO-Slow et MSO-Fast pour le test du labyrinthe radiaire. Cette voie n'a probablement pas été privilégiée lors de la sélection de notre modèle.

La voie sérotoninergique, et plus particulièrement, celle du récepteur 5-HT_{1A}, est quant à elle impliquée dans l'anxiété (Kalynchuk *et al.*, 2006 ; Prut et Belzung, 2003). De plus, l'intervention de cette voie dans le processus d'apparition des crises a été démontré (Richerson et Buchanan, 2011). Cependant, l'augmentation de sérotonine et/ou la diminution des récepteurs sérotoninergiques peut être considérée comme une réponse pour protéger de l'apparition des crises mais ne sont pas directement impliqués dans ces mécanismes d'apparition (Blizard et Balkoski, 1982 ; Tripathi *et al.*, 2008). Aussi, un fort taux de sérotonine va permettre de diminuer le nombre de crises mais va avoir comme effet secondaire potentiel une augmentation de l'anxiété. Ce trouble a été décrit dans des modèles animaux (Kalynchuk *et al.*, 2006) mais également chez des patients épileptiques traités avec des anticonvulsivants induisant une augmentation de sérotonine (Ahmad *et al.*, 2005 ; VanCott *et al.*, 2010). L'anxiété des souris MSO-Fast peut être due à l'implication de cette voie en raison d'un taux de sérotonine élevé.

La voie principalement associée avec l'anxiété reste la voie GABAergique (Belzung et Griebel, 2001 ; Mula et Monaco, 2009 ; Venault et Chapouthier, 2007). L'anxiété des MSO-Fast révélée par tous les paramètres d'anxiété mesurés (déplacements, redressements, occupation du centre de l'open field et défécations) pourrait donc être due à l'implication de cette voie de neurotransmission directement ou indirectement, par diminution du potentiel excitateur de la voie glutamatergique.

Les récepteurs glutamatergiques sont décrits comme intervenant essentiellement dans l'apprentissage (Perkinton *et al.*, 1999 ; Simonyi *et al.*, 2005 ; Zilles *et al.*, 2000) et la voie dopaminergique est alors associée pour son rôle dans la recherche de récompenses (Kheirbek *et al.*, 2008). L'absence de différence entre les souris MSO-Slow et MSO-Fast pour l'apprentissage nous conduit à penser qu'il n'y a pas de différence au niveau des récepteurs glutamatergiques principalement impliqués dans cette fonction, à savoir les récepteurs glutamatergiques ionotropes (Perkinton *et al.*, 1999 ; Zilles *et al.*, 2000) et certains récepteurs métabotropes (Pekhletski *et al.*, 1996 ; Simonyi *et al.*, 2005).

En outre, certains types de récepteurs glutamatergiques sont également liés à l'anxiété. Ils peuvent donc intervenir dans le mécanisme d'apparition des crises à la MSO au vue de la différence observée entre les souris MSO-Fast et les souris MSO-Slow pour cet aspect comportemental. Cette fonction implique essentiellement les récepteurs NMDA (Hashimoto *et al.*, 2007 ; Nowak *et al.*, 1995) et mGluR, de préférence post-synaptiques (Duvoisin *et al.*, 2010 ; Krystal *et al.*, 2010 ; Mares *et al.*, 2010). Ces deux types de récepteurs

glutamatergiques sont donc des cibles potentielles de la MSO d'après la différence observée entre les deux lignées pour l'anxiété.

IV - Mise en évidence de la voie glutamatergique par l'étude *in vivo*

L'étude réalisée avec les convulsivants et les anticonvulsivants écarte les voies GABAergique et muscarinique et conforte la voie glutamatergique alors que la comparaison des souris par l'apprentissage et l'anxiété a permis d'écarter uniquement la voie muscarinique comme cible principale de la MSO. Les tests comportementaux ne permettent pas en revanche de conclure sur les voies GABAergique, sérotoninergique et glutamatergique.

À l'inverse, la voie sérotoninergique est probablement différente entre les deux lignées, les MSO-Fast étant plus anxieuses que les MSO-Slow. Un taux anormal de sérotonine est souvent associé à l'épilepsie sans toutefois en être la cause (Blizard et Balkoski, 1982). Il est donc fort probable que ce taux élevé ne soit qu'une conséquence physiologique pour lutter contre les crises, une autre voie est à rechercher dans l'apparition des crises induites par la MSO.

Les résultats avec les convulsivants et les anticonvulsivants semblent indiquer que la voie glutamatergique est la principale voie d'action de la MSO. La voie GABAergique pourrait être impliquée dans une faible mesure car cette voie est très liée à la voie glutamatergique par des mécanismes de régulation. Une discrimination dans les types de récepteurs glutamatergiques peut même être faite. Les résultats obtenus avec les tests comportementaux nous indiquent que la différence entre les deux lignées consanguines est en effet plus en relation avec les récepteurs glutamatergiques métabotropes et NMDA qu'avec les récepteurs ionotropes AMPA et kaïnate.

La MSO pourrait en effet se fixer sur des récepteurs post-synaptiques, mGluR ou NMDA, en ciblant un ou plusieurs sous-types de récepteurs, ou n'interagir avec aucun récepteur. Bien que l'action de la MSO sur la voie glutamatergique a parfois été discutée en raison notamment de la diminution du taux de glutamate pendant les crises, cette voie est celle admise aujourd'hui comme mécanisme d'action de la MSO, l'une des cibles étant la glutamine synthétase (Eid *et al.*, 2008 ; Lamar et Sellinger, 1965 ; Ronzio *et al.*, 1969 ; Zou *et al.*, 2010). Tous nos résultats obtenus lors des tests *in vivo* sont en accord avec cette hypothèse sans toutefois élucider complètement le mécanisme d'action.

Des études biochimiques sont donc nécessaires pour compléter les résultats obtenus, avec comme cible prioritaire la voie glutamatergique. Les récepteurs potentiellement impliqués ont une localisation très hétérogène (pré-, post- et extra-synaptique) avec une implication des hétérorécepteurs dans la plupart des voies de neurotransmissions (Nankai *et al.*, 1998). C'est pourquoi une étude plus complète des voies de neurotransmission, et plus particulièrement de la voie sérotoninergique, avec effet de la MSO est également réalisée par la suite.

DEUXIÈME PARTIE : Étude des métabolismes glutamatergique et glucidique chez les lignées MSO-Slow et les MSO-Fast

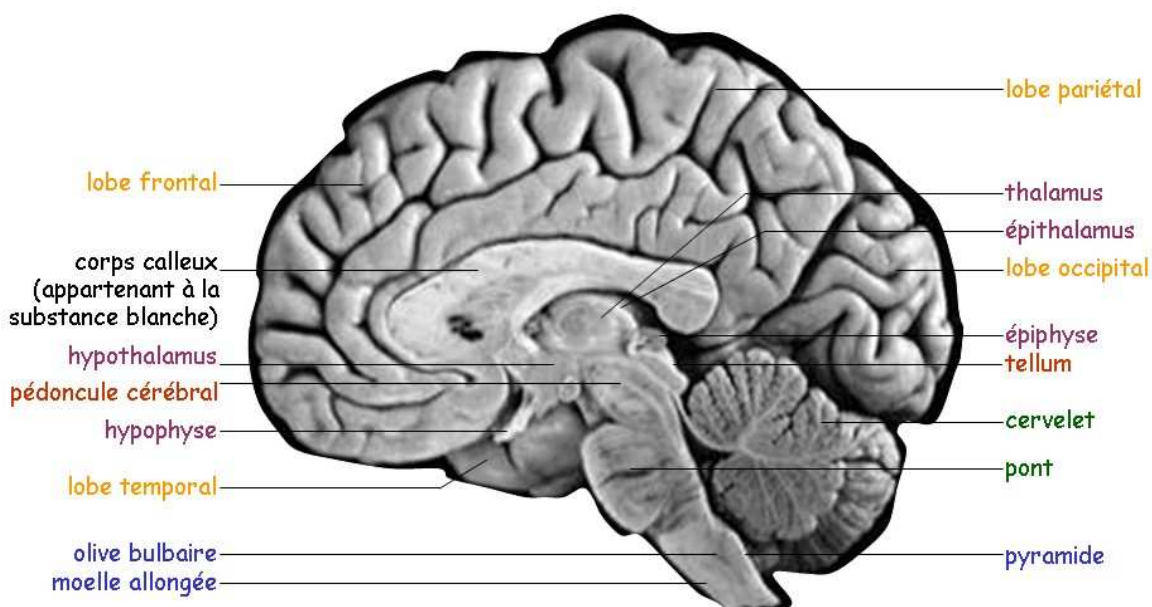
Étude des différences dans les voies métaboliques glutamatergique et glucidique des deux lignées, en basal et après injection de MSO, par l'étude du taux de glycogène, de l'activité de la glutamine synthétase et d'une modification post-traductionnelle, la glycosylation.

Introduction

La voie de signalisation glutamatergique est impliquée dans la latence d'apparition des crises induites par la MSO dans le modèle murin en cours de sélection (Cloix *et al.*, 2010b). Cette voie a été confirmée par une étude des temps de latence à différents convulsivants et l'effet d'anticonvulsivants. Une étude comportementale réalisée sur les deux lignées de souris consanguines a également suggéré l'implication de cette voie. Il est préférable, pour analyser au mieux cette voie, de cibler la ou les zone(s) du cerveau où la voie glutamatergique est prépondérante plutôt que le cerveau en entier de manière à optimiser la mise en évidence de différences entre les lignées MSO-Slow et MSO-Fast.

I - Organisation tissulaire du cerveau

Le cerveau, organe principal du système nerveux central (SNC), est composé de la substance grise et de la substance blanche. Alors que la substance blanche ne contient que des prolongements neuronaux, la substance grise est une partie du cerveau plus complexe. Elle est constituée de différentes structures apparues au cours de l'évolution des espèces animales. Ces structures appartiennent à l'une des 5 zones du cerveau, le myélocéphale, le métencéphale, le mésencéphale, le diencéphale et le télencéphale (ou cortex cérébral), dont l'organisation est présentée en figure 28. L'importance de cet organe a conduit à son isolation du reste du corps par la création de la barrière hémato-encéphalique. Celle-ci est constituée de cellules épithéliales liées entre elles par des jonctions serrées.



zones du myélocéphale, du métencéphale, du mésencéphale, du diencéphale, du télencéphale

Figure 28 : Schéma général d'un cerveau humain.

Le cortex cérébral, formé de deux hémisphères séparés incomplètement par la scissure interhémisphère, est isolé de la boîte crânienne par un tissu protecteur composé de méninges

puis par le liquide céphalorachidien. Le cortex cérébral constitue la zone du cerveau où sont localisées les fonctions les plus complexes et représente la partie la plus importante par rapport au reste du cerveau chez l'homme au regard de la plupart des autres animaux, notamment la souris.

De plus, les régions du cerveau diffèrent entre elles par leurs spécificités au niveau des neurotransmetteurs, le cortex cérébral étant par exemple associé aux neurones glutamatergiques et GABAergiques. C'est pourquoi, d'après les études *in vivo* impliquant la voie glutamatergique dans le modèle murin sélectionné par le Laboratoire de Neurobiologie, cette zone est choisie préférentiellement pour les études biochimiques.

II - Organisation cellulaire du cerveau

Les cellules du système nerveux se divisent en deux groupes suivant leurs fonctions. Les cellules assurant la transmission et le traitement de l'information constituent le premier groupe, c'est-à-dire les neurones. Les cellules assurant les autres fonctions font partie du second groupe, la glie. Tous ces types de cellules interagissent entre eux comme le montre la figure 29.

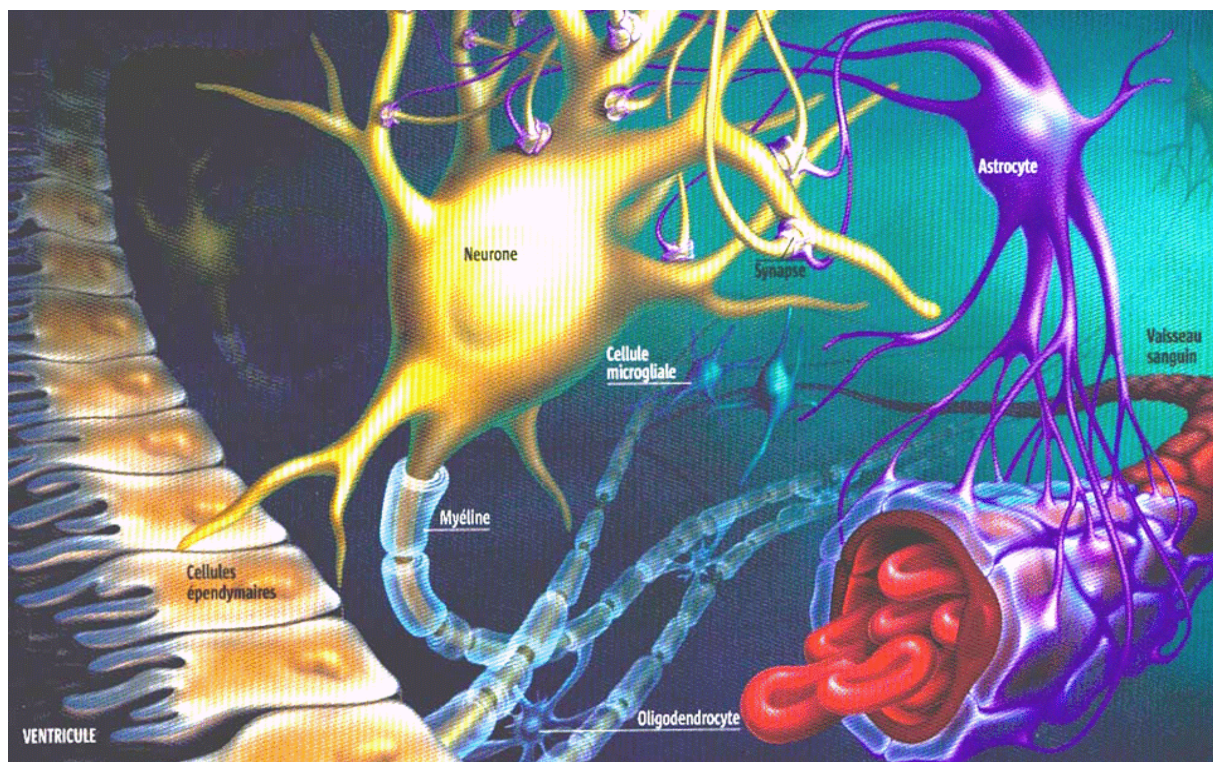


Figure 29 : Schéma des différentes cellules cérébrales et de leurs principales interactions entre elles (Pfrieger et Steinmetz, 2003).

II.A - Les neurones

Les neurones, associés entre eux dans un réseau complexe, assurent la transmission de l'information par une modification de la polarisation de la membrane cytoplasmique. Il s'agit du potentiel d'action. Les neurones, représentant près de 10% des cellules nerveuses, ont des

longueurs très variables allant de quelques μm à plusieurs dizaines de cm et peuvent se prolonger bien au-delà du cerveau. Ils sont constitués le plus souvent de dendrites, d'un corps cellulaire (ou soma) et d'un axone permettant respectivement de recevoir, de traiter et d'émettre l'information.

L'axone se divise en plusieurs prolongements se terminant chacun par une synapse qui peut être électrique ou chimique. Les synapses électriques impliquent une proximité des membranes des neurones pré- et post-synaptiques qui permet une propagation optimale du signal entre neurones. La transmission du signal est réalisée uniquement par la modification de la polarisation des membranes et le flux d'ions. Les synapses chimiques, bien que propageant l'information plus lentement par rapport à la synapse électrique, sont largement majoritaires. De plus, l'utilisation de neurotransmetteurs et de récepteurs associés permet une régulation plus fine au niveau de la synapse.

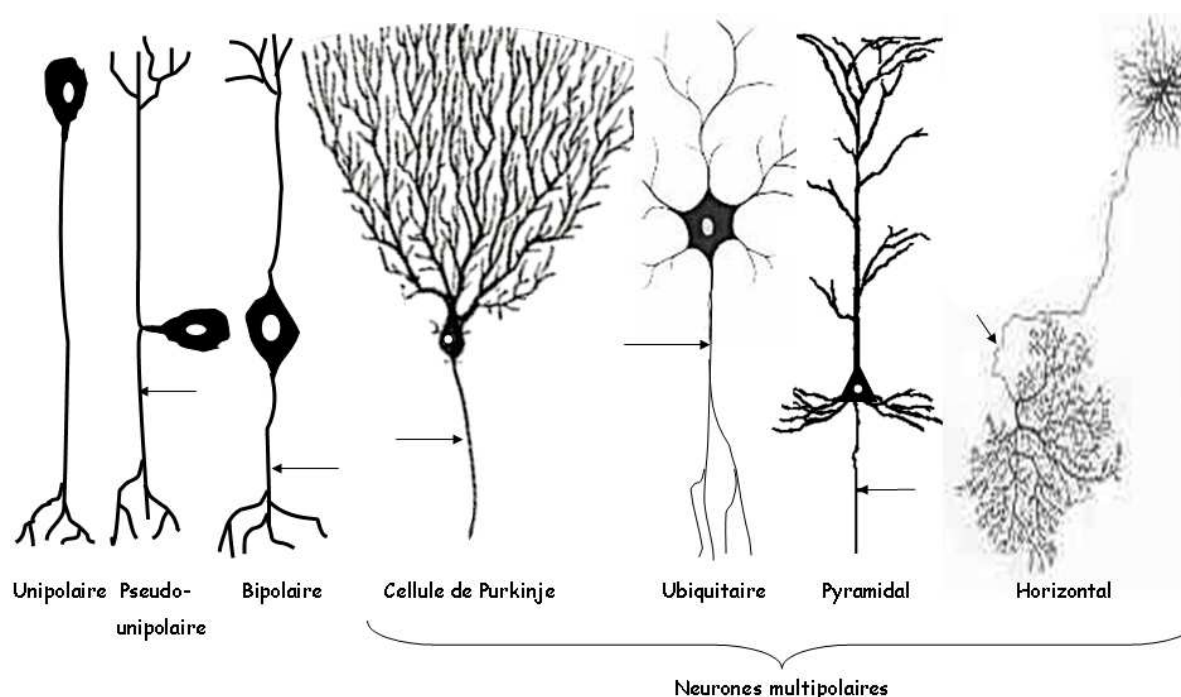


Figure 30 : Présentation des types de neurones les plus répandus chez l'homme.

Les axones sont indiqués par des flèches. Les neurones unipolaires peuvent avoir un axone ou une dendrite.

L'extrême spécialisation des neurones dans leur fonction de transmission du signal a conduit à une évolution dans leurs formes dont les principales sont présentées en figure 30. Leur métabolisme est également très spécialisé et certaines voies métaboliques, comme la glycogénèse, sont absentes. Afin d'assurer leur fonction de transmission de l'information, les neurones forment donc de nombreuses interactions avec les différents types cellulaires formant la glie.

II.B - La glie

Quatre types cellulaires forment principalement la glie. Il s'agit des microgliaocytes, des oligodendrocytes, des épendymocytes et des astrocytes. À cette liste peuvent être ajoutés les synantocytes, qui pourraient constituer un cinquième type, et des cellules gliales restreintes dans leurs localisations cérébrales.

II.B.1 - Les microgliocytes

Les microgliocytes sont les seules cellules appartenant à la microglie, contrairement aux autres cellules gliales faisant toutes partie de la macroglie. Elles ont la particularité d'avoir un état inactivé (cellules ramifiées) et un état activé (cellules amiboïdes). L'état activé permet aux cellules d'assurer leur fonction de macrophage. Les microgliocytes proviennent en effet de monocytes ayant atteint le cerveau par voie sanguine (Graeber *et al.*, 2002).

Ces cellules assurent donc seules la compétence immunitaire dans le SNC et sont activées dans des pathologies très diverses comme les infections virales ou les maladies auto-immunes ainsi que pour la protection générale du cerveau lors de lésions ou d'ischémie (Kreutzberg, 1996).

II.B.2 - Les oligodendrocytes

Localisées exclusivement dans le SNC, elles sont remplacées au niveau du SNP par les cellules de Schwann. Les oligodendrocytes se caractérisent par des extensions s'enroulant autour d'une partie d'un axone. Une fois l'enroulement terminé, les extensions s'élargissent pour donner des feuillettes qui constituent la gaine de myéline. Ils ont pour fonction de protéger l'axone et d'augmenter la vitesse de propagation de l'information qui ne peut être faite que par un mécanisme saltatoire au niveau des nœuds de Ranvier, les parties de l'axone ne possédant pas de myéline (Bauer *et al.*, 2009).

II.B.3 - Les épendymocytes

Les épendymocytes forment une barrière entre les cellules cérébrales et le liquide céphalo-rachidien grâce à des jonctions serrées sur leurs faces latérales. Leurs principales fonctions vont être étroitement liées à leur localisation. Ces cellules permettent en effet un échange sélectif mais protégé entre les cellules cérébrales et le liquide céphalo-rachidien. De plus, elles améliorent la circulation de ce dernier par la présence de cils vibratiles à leurs surfaces, en particulier au niveau des rétrécissements ventriculaires (Del Bigio, 2010).

II.B.4 - Les astrocytes

Les astrocytes, les plus nombreuses des cellules cérébrales, assurent le plus de fonctions parmi toutes les cellules gliales.

II.B.4.a - Caractéristiques générales des astrocytes

Les premiers astrocytes observés avaient une forme étoilée, ce qui leur a donné leur nom. Ils sont en effet constitués d'un corps cellulaire et de nombreux prolongements se terminant par des pieds astrocytaires. Ces prolongements sont maintenus en place par des filaments intermédiaires constitués de GFAP, pour Glial Fibrillary Acidic Protein (protéine acide fibrillaire gliale). L'importante quantité astrocytaire de GFAP permet de les différencier par un marquage immuno-histochimique ciblant cette protéine. Leur forme générale varie cependant en fonction de leur localisation. Les astrocytes de la substance blanche sont dits fibreux car ils ont un corps cellulaire de petit diamètre avec de longs prolongements alors que ceux présents dans la substance grise ont un large corps avec des prolongements courts. Ils sont alors appelés protoplasmiques.

II.B.4.b - Principales fonctions astrocytaires

Ces fonctions interviennent toutes dans la complémentarité astrocyte/neurone, excepté pour l'**intégrité de la barrière hémato-encéphalique**. Cette fonction astrocytaire a pour but de maintenir les jonctions serrées des épendymocytes et des cellules épithéliales sur leurs faces latérales (Abbott *et al.*, 2006).

Cette interaction avec la barrière hémato-encéphalique permet aux astrocytes d'assurer d'autres fonctions telles qu'une partie du **métabolisme cérébral** pour les neurones. La majorité des échanges de molécules passant la barrière hémato-encéphalique, telles que les ions K^+ , la glutamine ou le glucose, est réalisée avec les astrocytes. Le glucose sanguin peut passer dans le parenchyme cérébral et être utilisé par toutes les cellules nerveuses mais seuls les astrocytes peuvent capter du glucose sanguin ou parenchymal pour le stocker sous forme de glycogène. Les microgliocytes peuvent produire du glycogène dans une moindre mesure à partir du glucose parenchymal. Ce sont les réserves des astrocytes qui permettent de répondre à un besoin immédiat d'énergie des neurones (Nehlig et Coles, 2007).

L'échange de métabolites permet également d'assurer **la neuroprotection**. Les neurones ne possèdent pas en effet la plupart des enzymes appartenant aux voies métaboliques de détoxification telles que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase ou la catalase (Takuma *et al.*, 2004). Ces échanges sont réalisés essentiellement au niveau du corps cellulaire du neurone.

La synapse est également un autre point de contact entre les neurones et les astrocytes. Ces derniers participent en effet activement à **la neuroplasticité**. Ils contrôlent tout d'abord chez l'adulte la migration des neuroblastes jusqu'à leurs destinations avant la différenciation en neurones fonctionnels (Ma *et al.*, 2005). Puis la formation des synapses, notamment au niveau embryonnaire, est assurée en partie par les astrocytes grâce notamment aux thrombospondines astrocytaires (Christopherson *et al.*, 2005). Enfin, la rétractation des prolongements astrocytaires impliqués dans les synapses est corrélée avec une perte de leur fonctionnalité (Hirrlinger *et al.*, 2004).

Ces prolongements astrocytaires interviennent également dans **la neurotransmission**. La concentration de certains éléments de la fente synaptique doit être contrôlée afin de garantir une propagation optimale de l'information et ce contrôle est assuré en grande partie par les astrocytes. D'une part, l'élimination de l'excès de la plupart des neurotransmetteurs est réalisé grâce à des transporteurs exprimés par les astrocytes uniquement au niveau de la synapse (Bak *et al.*, 2006 ; Danbolt, 2001). D'autre part, l'homéostasie potassique est nécessaire pour assurer la propagation de l'influx nerveux au niveau des synapses. Les astrocytes maintiennent une concentration extracellulaire faible en ion K^+ grâce à de nombreux transporteurs. Le transport peut être, soit facilité par antiport de Na^+/K^+ ou de Cl^-/K^+ , soit actif avec des ATPases Na^+/K^+ (Gee et Keller, 2005). Les astrocytes peuvent aussi moduler la sécrétion de neurotransmetteurs grâce à des gliotransmetteurs tels que l'ATP, le glutamate ou la D-sérine (Parpura et Zorec, 2010).

II.B.4.c - La culture *in vitro* d'astrocytes

La neurotransmission implique *de facto* les neurones, mais également les astrocytes. Alors que des études biochimiques *ex vivo* du cortex cérébral permettent de se rapprocher des conditions biologiques en gardant l'interaction entre les différents types cellulaires, la culture *in vitro* d'astrocytes peut conduire à une implication plus précise de ce type cellulaire dans la différence entre les lignées de souris MSO-Slow et MSO-Fast. Cette approche a déjà permis de mettre en évidence l'effet de la MSO sur certaines voies métaboliques comme la glyconéogenèse ou la glycolyse, détaillées dans la partie IV pages 83 à 88, (Bernard-Hélary *et al.*, 2002).

II.B.5 - Les synantocytes

La classification de ces cellules est actuellement débattue pour savoir si elles doivent être considérées comme des astrocytes différenciés ou comme un cinquième type de cellule gliale à part entière (Krawczyk et Jaworska-Adamu, 2010). Les synantocytes possèdent des extensions jusqu'aux synapses. Contrairement aux astrocytes, celles-ci ne possèdent pas de transporteurs de neurotransmetteurs mais uniquement des récepteurs ionotropes considérés comme puissants, comme par exemple les récepteurs AMPA et KA pour le glutamate, à l'inverse des récepteurs NMDA. De plus, ces cellules ne possèdent pas de GFAP, protéine caractéristique des astrocytes (Butt *et al.*, 2005).

II.B.6 - Les cellules gliales cérébrales non ubiquitaires

Ces cellules peuvent s'ajouter aux cellules gliales présentes ou remplacer un type cellulaire. Les tanocytes et les pituicytes font exclusivement partie du système hypothalamo-hypophyséal et jouent le même rôle que les épendymocytes et les astrocytes respectivement (Wittkowski, 1998).

Les cellules gliales radiaires sont quant à elles essentiellement présentes chez l'embryon pour engendrer les astrocytes, les oligodendrocytes, les épendymocytes et les cellules souches neuronales (Malatesta *et al.*, 2008). Certaines zones neuronales conservent néanmoins, une fois son développement terminé, certaines de ces cellules. Ce sont les cellules de Müller présentes dans la rétine et les cellules de Bergmann présentes dans le cervelet. De par leur fonction et leur structure, elles sont considérées comme très proches des astrocytes, les cellules de Müller allant même jusqu'à remplacer les astrocytes dans la rétine (Poitry *et al.*, 2000 ; Pow *et al.*, 2000).

III - Le métabolisme glutamatergique

Plusieurs études ont démontré que la voie métabolique cérébrale du glutamate implique les astrocytes et les neurones et que chaque type cellulaire a sa propre spécificité enzymatique dans le cycle (van den Berg et Garfinkel, 1971).

III.A - Transformation en GABA

La proportion de GABA recyclée par les neurones GABAergiques est plus importante que la proportion de glutamate recyclée par les neurones glutamatergiques. La principale

source neuronale de GABA reste néanmoins la synthèse par la glutamate décarboxylase à partir de glutamate (Liang *et al.*, 2006). Cette enzyme nécessite comme co-facteur du phosphate de pyridoxal, un dérivé de la vitamine B6. C'est pourquoi une carence en cette vitamine provoque un déséquilibre dans la balance des voies GABAergiques et glutamatergiques en défaveur du GABA, conduisant entre autre à l'apparition de crises épileptiques (D'Hulst *et al.*, 2009).

III.B - La glutamine comme intermédiaire

Le cycle glutamate-glutamine se partage entre le neurone et l'astrocyte, comme le montre la figure 31.

III.B.1 - La glutamine dans le cycle glutamate-glutamine

La voie la plus efficace pour modifier le glutamate en un métabolite exportable vers le neurone est la transformation en glutamine par la glutamine synthétase (GS) (Cremer *et al.*, 2010). Cette enzyme est, au niveau cérébral, localisée exclusivement au niveau des cellules astrocytaires et microgliales (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977). Cette réaction ne nécessitant qu'une seule étape consomme néanmoins de l'énergie *via* une molécule d'ATP. La réaction est décrite en figure 32.

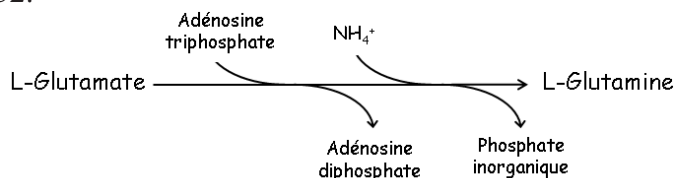


Figure 32 : Réaction catalysée par la glutamine synthétase

L'activité enzymatique est régulée principalement par la concentration de glutamate et d'ammoniaque mais d'autres facteurs peuvent intervenir. Ainsi, l'augmentation d'oxyde nitrique issue de l'activation des récepteurs NMDA conduit à la nitratation de la GS. L'enzyme est alors moins active (Rodrigo et Felipe, 2007).

La glutamine, une fois transférée dans le neurone, est transformée en glutamate dans le neurone pré-synaptique au niveau de la mitochondrie grâce à la glutaminase activée par un groupement phosphate (Kvamme *et al.*, 2001). Une molécule d'ammonium est alors libérée et éliminée du neurone sous forme d'ammoniac, d'alanine (Zwingmann *et al.*, 2000) ou bien de leucine (Yudkoff *et al.*, 1996) qui sont ensuite capturés par l'astrocyte pour reformer de la glutamine.

Cette voie a l'avantage de recycler l'ammonium, qui est cytotoxique, produit par le neurone lors de la synthèse de glutamate à partir de la glutamine, permettant un équilibre entre les cellules astrocytaires et neuronales (Felipo et Butterworth, 2002). En effet, Berl *et al.* puis Cooper *et al.* (Berl *et al.*, 1962 ; Cooper *et al.*, 1979) ont montrés en injectant de l'ammoniaque marquée à l'¹³N que 80% de l'ammoniaque marquée cérébrale constituaient la fonction amide de la glutamine.

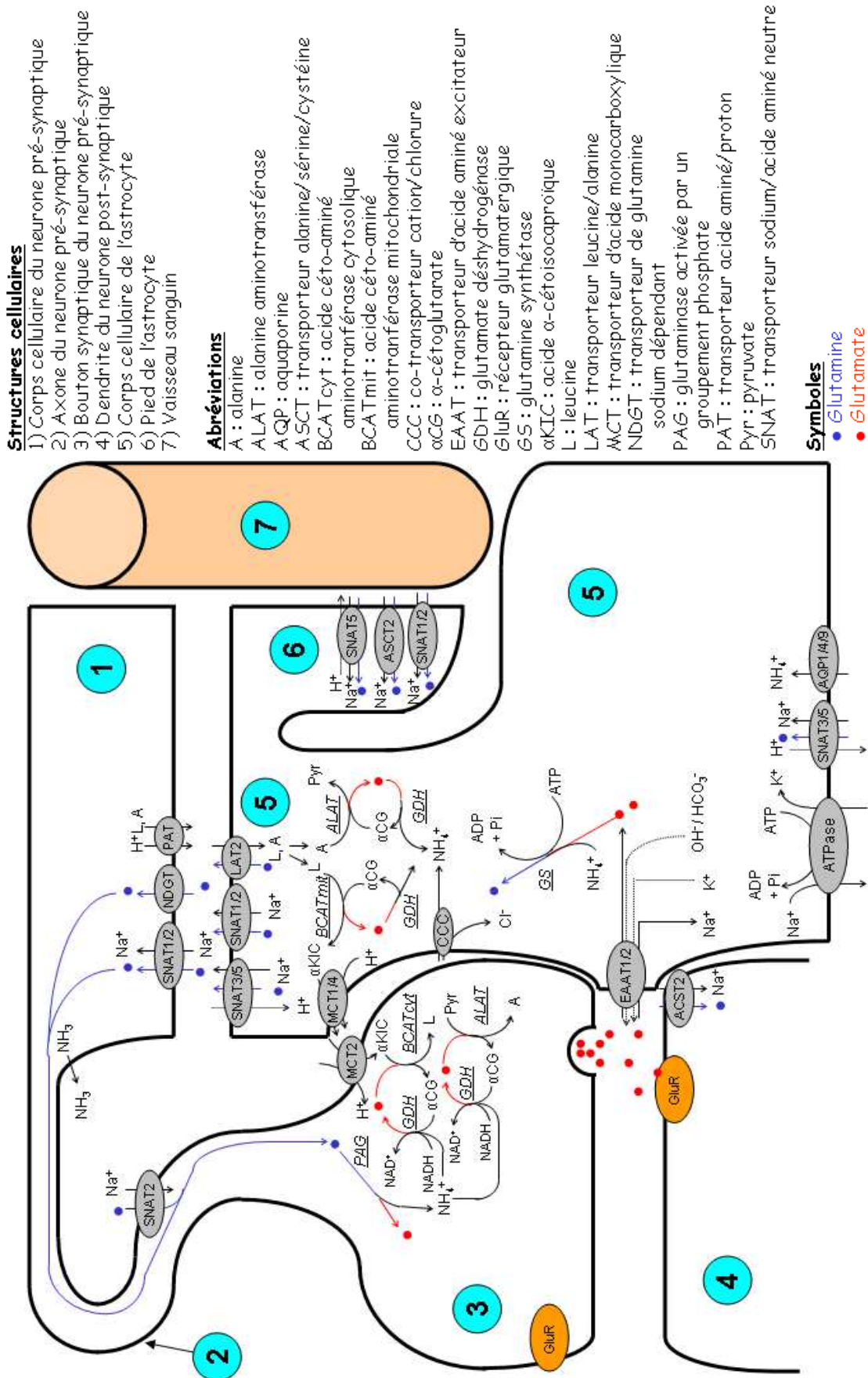


Figure 31 : Schéma du cycle de la glutamine pour le recyclage du glutamate

III.B.2 - Les transporteurs de glutamine et d'ammoniaque

La glutamine est exportée vers le neurone grâce à des systèmes de transporteurs composés chacun de plusieurs sous-unités (Chaudhry *et al.*, 2002). Certains de ces transporteurs, peu spécifiques de la glutamine, peuvent être utilisés également pour une gamme plus ou moins large d'acides aminés et sont décrits dans le tableau 3.

Tableau 3 : Transporteurs utilisés pour la régulation corticale intercellulaire de glutamine

Transporteur	Type cellulaire	Spécificité de localisation	Références
SNAT1	neurone et astrocyte	corps cellulaire des neurones	(Melone <i>et al.</i> , 2004 ; Varoqui <i>et al.</i> , 2000)
SNAT2	neurone et astrocyte		(Melone <i>et al.</i> , 2006)
SNAT3	astrocyte		(Bröer <i>et al.</i> , 2009 ; Sidoryk-Wegrzynowicz <i>et al.</i> , 2009)
SNAT5	astrocyte	ped astrocytaire, membrane plasmique proche des synapses et des corps cellulaires des neurones	(Cubelos <i>et al.</i> , 2005 ; Nakanishi <i>et al.</i> , 2001)
ASCT2	neurone et astrocyte	ped astrocytaire et dendrites neuronales	(Gegelashvili <i>et al.</i> , 2006 ; Gliddon <i>et al.</i> , 2009)
LAT2	astrocyte	mis en évidence du rôle de co-transporteur avec la L-alanine et la L-leucine mais pas d'étude précise de localisation	(Bak <i>et al.</i> , 2006 ; Kim <i>et al.</i> , 2004)
Non identifié	neurone	aucune étude précise de localisation	(Rae <i>et al.</i> , 2003 ; Tani <i>et al.</i> , 2010)

Bien que non identifié, la présence d'un transporteur neuronal complémentaire de SNAT1 et SNAT2 est admise. Il se caractérise par une insensibilité à l'acide 2-(methylamino)isobutyrique, un inhibiteur de SNAT1 et SNAT2.

Un autre transporteur astrocytaire, non identifié, a parfois été impliqué dans l'efflux et/ou dans l'influx de glutamine (Deitmer *et al.*, 2003). Le manque d'information, l'imprécision quant à ses co-facteurs et en particulier les acides aminés neutres, la mise en évidence seulement dans des cultures non-astrocytaires ou astrocytaires non-spécifiques d'une région cérébrale et l'absence d'articles récents sur ce transporteur conduisent à considérer ce transporteur comme hypothétique ou peu impliqué dans le transport cortical de glutamine.

Outre la diffusion passive d'ammoniac, il existe une multitude de transporteurs utilisés pour le retour sous forme d'ammonium vers l'astrocyte. Des co-transporteurs cation-chlorure permettent une entrée facilitée en fonction du pH dans l'astrocyte (Marcaggi et Coles, 2000). L'ammoniaque peut être également transportée grâce à des aquaporines (Bak *et al.*, 2006). L'échange d'acide α -cétoisocaproïque entre neurone et astrocyte est réalisé quant à lui grâce à des transporteurs d'acides monocarboxyliques (Mac et Nalecz, 2003) et l'export d'alanine et de leucine est médié par des co-transporteurs acide aminé/proton (Rubio-Aliaga *et al.*, 2004).

Le recyclage du glutamate par le cycle de la glutamine nécessite au total 7 transporteurs différents ayant chacun leurs spécificités dans leurs localisations, dans les molécules transportées et dans leurs régulations. Aussi, chacun est une cible potentielle dans les mécanismes de résistance ou de sensibilité à la MSO dans le modèle murin étudié.

III.C - Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs permet de produire de l'énergie en condition aérobie mais le recyclage du glutamate peut également utiliser cette voie plus complexe car nécessitant plus d'enzymes. Son implication a été démontrée *in vitro* (McKenna *et al.*, 1996) et déduite d'après les données *in vivo* (Hassel et Sonnewald, 1995) par radiomarquage au ^{13}C d'acétate et de glucose. Le recyclage du glutamate par le cycle de Krebs, dont le principe général est présenté en figure 33, commence dans l'astrocyte et se termine dans le corps cellulaire du neurone.

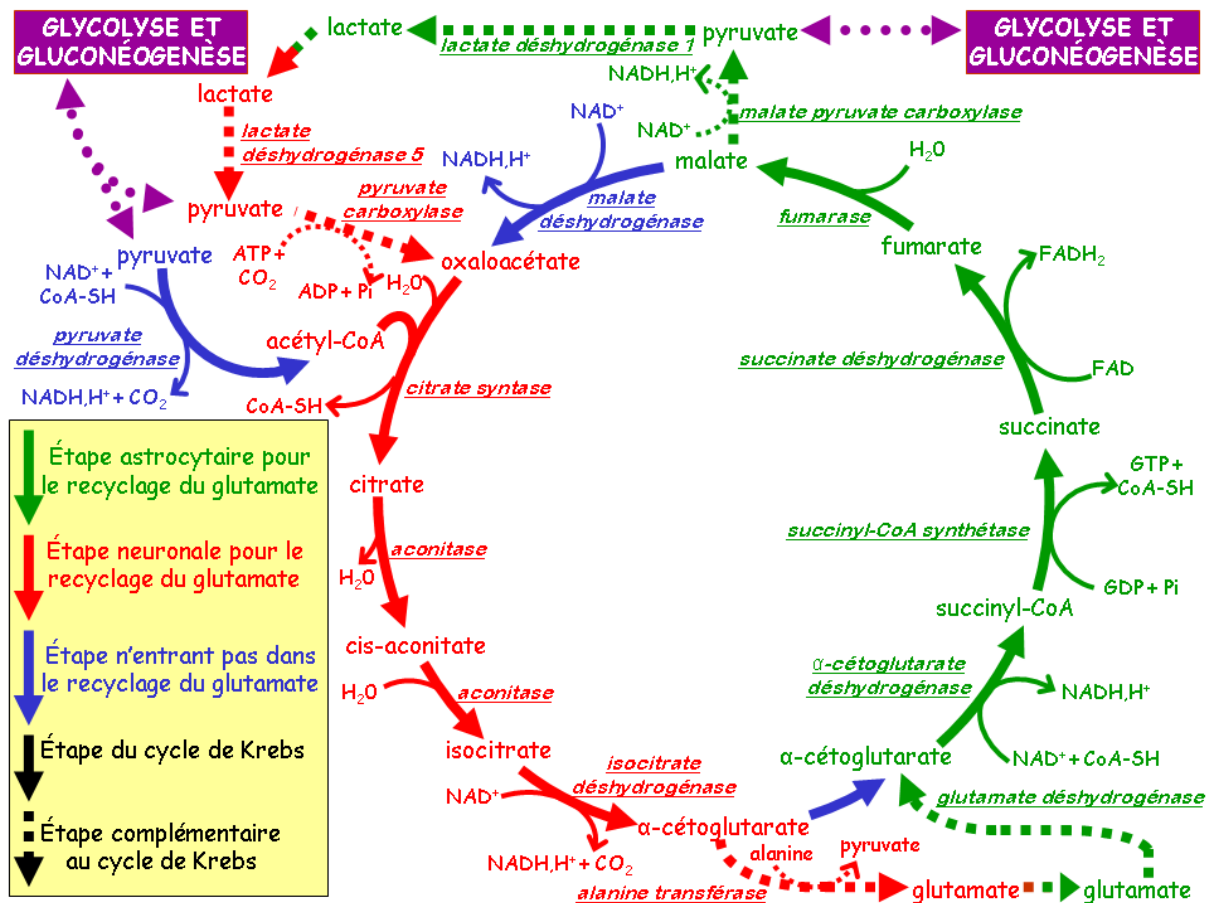


Figure 33 : Recyclage du glutamate issu de la neurotransmission par le cycle de Krebs

Le glutamate astrocytaire issu de la neurotransmission est d'abord converti en α-cétoglutarate par une déamination catalysée par la glutamate déshydrogénase ou par une transamination catalysée par une transaminase. L'α-cétoglutarate formé entre dans le cycle de Krebs et doit en ressortir sous forme de malate pour que le recyclage du glutamate soit poursuivi. Le malate est alors décarboxylé par la pyruvate-malate carboxylase pour former le pyruvate, lui-même transformé en lactate par la lactate déshydrogénase 1. Le lactate est le dernier métabolite produit par l'astrocyte. Le lactate est transféré vers le neurone grâce aux

transporteurs d'acides monocarboxyliques pour poursuivre le cycle de recyclage (Cloix et Hévor, 2009).

Le lactate, une fois dans le neurone, permet de recouvrer le glutamate en réintégrant le cycle de Krebs. Après une transformation du lactate par la lactate déshydrogénase 5, le pyruvate est carboxylé pour intégrer le cycle de Krebs sous forme d'oxaloacétate jusqu'à l' α -cétoglutarate. La dernière enzyme, l'alanine transférase, permet la production du glutamate qui migre ensuite vers le bouton synaptique pour servir de neurotransmetteur.

IV - Le métabolisme glucidique

Le glucose est l'un des nutriments majeurs des cellules du système nerveux adulte. Le cerveau mature du corps humain ne représente que 2 à 3% de la masse d'un individu mais peut consommer jusqu'à 25% du glucose présent dans la circulation sanguine. La voie métabolique du glucose interagit avec la voie métabolique glutamatergique au niveau du pyruvate. Du glucose astrocytaire peut donc entrer dans le cycle glutamate-glutamine (Wiesinger *et al.*, 1997).

IV.A - Entrée du glucose dans l'astrocyte

Le passage du glucose sanguin se fait principalement par des transporteurs uniports de glucose (GLUT) à travers la membrane plasmique des cellules endothéliales et gliales. Des transporteurs de glucose supplémentaires sont exprimés à la surface des neurones. Il s'agit de canaux transporteurs de glucose sodium-dépendants (SGLT).

La réaction limitante pour l'introduction du glucose dans les différentes voies intracellulaires est sa phosphorylation en glucose-6-phosphate par l'hexokinase, une enzyme irréversible. Cette enzyme est liée à la porine mitochondriale lorsqu'elle est inactive et devient soluble et active dans le cytoplasme. L'équilibre entre les formes active et inactive a été étudié par immunohistochimie il a été révélé que 30% de l'hexokinase astrocytaire est cytosolique. La mobilisation de l'enzyme et les causes de sa mobilisation par la cellule restent à approfondir. Le glucose phosphorylé en position 6 est un intermédiaire de la glycolyse et la molécule de départ de la voie des pentoses phosphate et de la glycogénèse.

IV.B - Les principales voies utilisant le glucose

IV.B.1 - La glycolyse et gluconéogenèse

Le glucose-6-phosphate formé peut poursuivre dans la voie de dégradation du glucose, la glycolyse, pour être transformé en pyruvate (figure 34). La voie inverse est la gluconéogenèse.

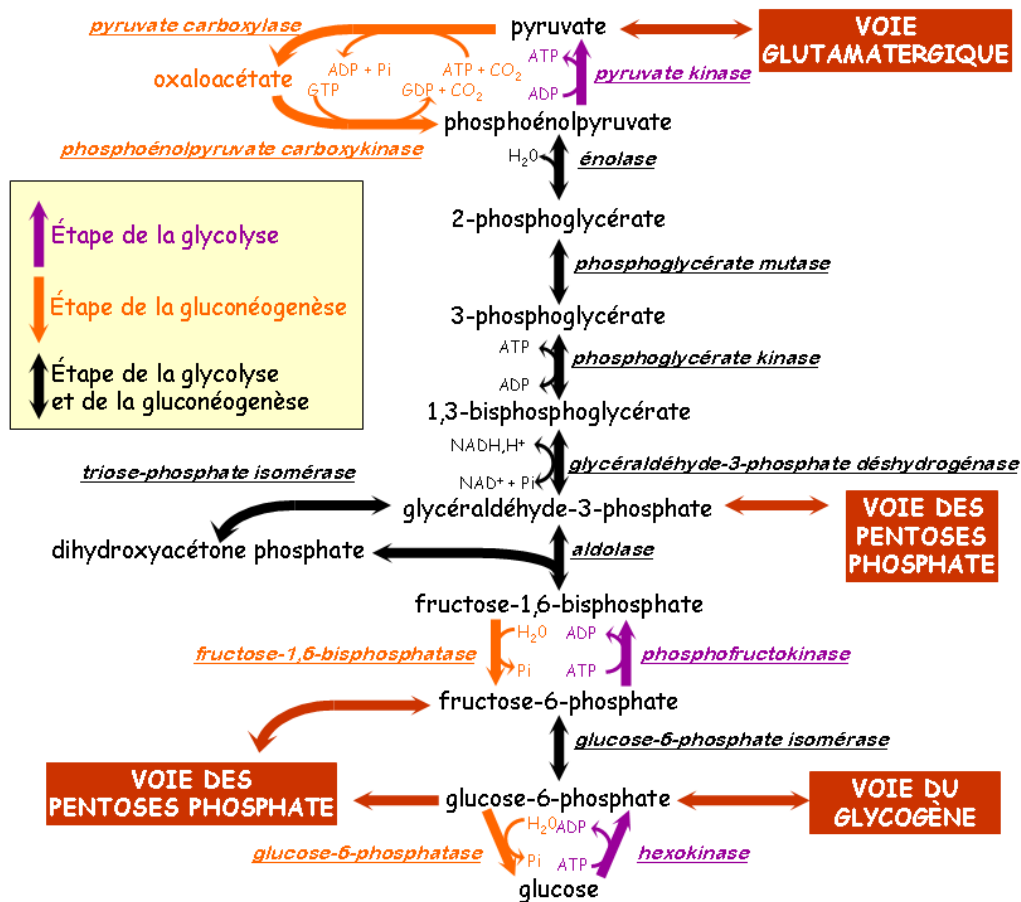


Figure 34 : Glycolyse et gluconéogenèse

La glycolyse permet la production d'énergie sous forme d'ATP et de NADH. Deux étapes de la glycolyse sont irréversibles en plus de la transformation du glucose en glucose-6-phosphate. Ces trois réactions sont catalysées par des kinases. Deux phosphatases permettent les réactions inverses lors de la gluconéogenèse pour la transformation du fructose-1,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate et du glucose-6-phosphate en glucose. La cascade de réactions du pyruvate jusqu'au fructose-1,6-bisphosphate utilise deux enzymes spécifiques, la pyruvate carboxylase et la phosphoénolpyruvate carboxykinase, pour transformer le pyruvate en phosphoénolpyruvate avec comme intermédiaire l'oxaloacétate.

IV.B.2 - La glycogénèse

IV.B.2.a - Structure du glycogène

Le glycogène constitue une réserve énergétique importante dans le monde animal. Cette molécule est une agrégation d'unités glucose liées en α 1-4 pour former une chaîne principale. Une ramification est créée environ tous les 10 résidus par une liaison en α 1-6 entre deux unités glycosyles. La taille d'une molécule de glycogène est d'environ 10^6 Da. Lorsque la concentration en glucose est élevée, le glycogène forme des particules, appelées particules β , dont le poids moléculaire est de 10^7 Da. Dans des conditions particulières, comme l'injection de MSO, le glycogène cérébral forme des particules appelées particules α , dont le poids moléculaire est de 10^8 Da (Phelps, 1975).

Dans la cellule astrocytaire, le nombre de particules glycogéniques reste constant mais la taille d'un polymère peut augmenter ou diminuer selon l'activité neuronale. Deux niveaux de glycogène peuvent être distingués: le proglycogène et le macroglycogène. Le proglycogène est prédominant au début de la reconstitution du glycogène. Il est plus petit que le macroglycogène qui apparaît plus tard et contient une plus grande quantité de glucose par molécule de glycogène.

IV.B.2.b - Synthèse et dégradation du glycogène

La glycogénèse est la voie de synthèse du glycogène alors que la glycogénolyse est la voie de sa dégradation (figure 35). L'interaction avec les autres voies métaboliques est réalisée au niveau du glucose-6-phosphate.

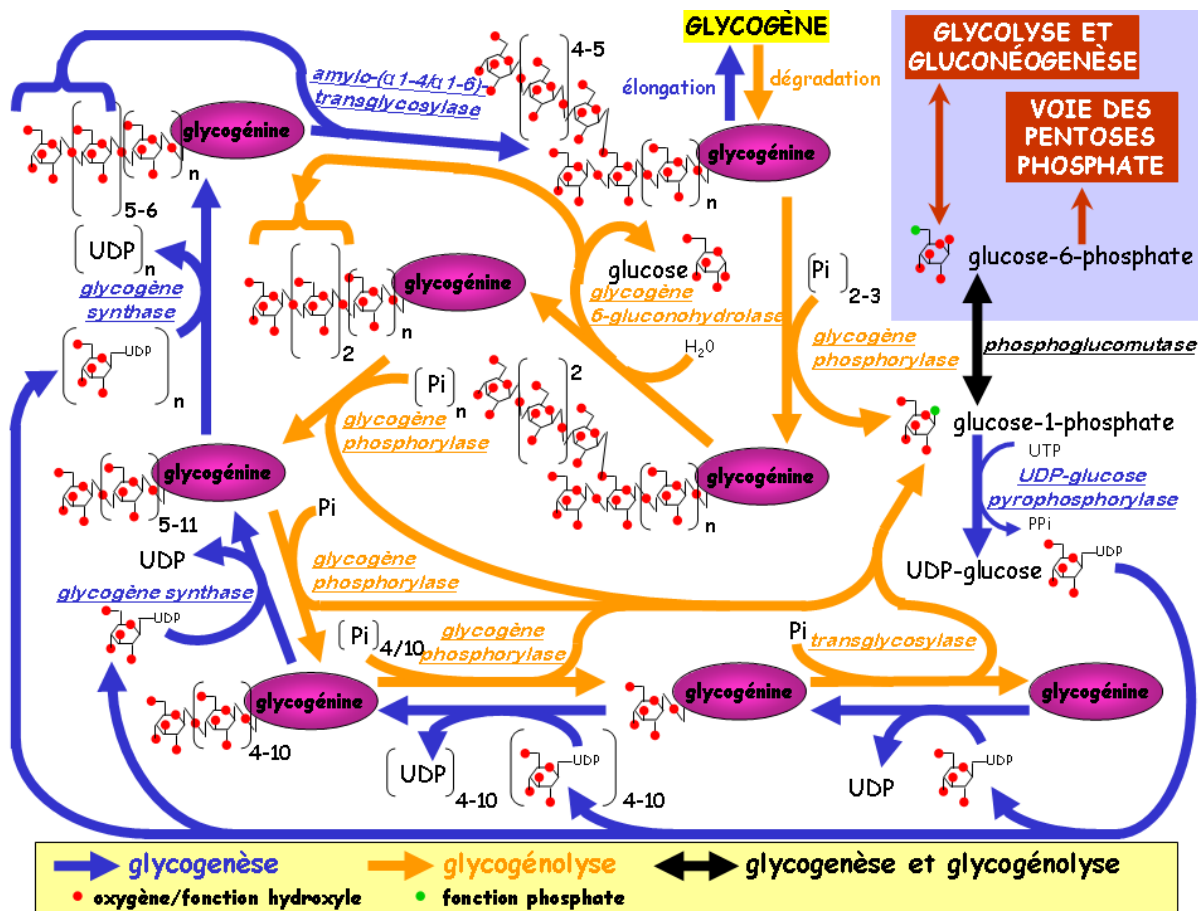


Figure 35 : Glycogénèse et glycogénolyse

Deux étapes composent la glycogénèse : l'initiation et l'élongation. L'initiation correspond à l'amorce du premier résidu de glucose sur le résidu tyrosine de la glycogénine et à l'ajout de 7 à 9 résidus de glucose. La glycogénine est une enzyme cytosolique qui se glycosyle elle-même. L'élongation consiste en l'ajout de glucose aux résidus précédents par des liaisons α 1-4 par la glycogène synthase (GlyS) en présence d'UDP-glucose. La synthèse d'UDP-glucose se fait par addition d'UTP sur le glucose-1-phosphate et est catalysée par la pyrophosphorylase. Une seconde enzyme, l'amylo-(α 1-4/ α 1-6)-transglycosylase (enzyme de branchement), permet la ramification du glycogène en ajoutant des résidus de glucose par des liaisons α 1-6. De l'ARNm de la GlyS a été identifié par hybridation *in situ* dans des neurones,

sans pour autant que le taux de transcrits varie en fonction des conditions expérimentales, contrairement aux études réalisées sur des astrocytes (Pellegri *et al.*, 1996).

La dégradation du glycogène cérébral est réalisée par une isoforme de la glycogène phosphorylase (GlyP) spécifique au cerveau, l'isoforme B (pour Brain). Les neurones ne possèdent pas quant à eux cette enzyme (Wiesinger *et al.*, 1997). Le glucose libéré par la GlyP est sous forme de glucose-1-phosphate. D'autre part, une enzyme de débranchement est nécessaire pour supprimer les ramifications. Lorsque la ramification ne compte plus que 4 unités glycosyles, la glycogène-6-gluconohydrolase permet de transférer les 3 unités glycosyles situées en position terminale vers une autre branche du glycogène. L'unité glycosyle restante et liée en α 1-6 est libérée sous forme de glucose par cette même enzyme.

IV.B.2.c - Régulation de la glycogénèse et de la glycogénolyse

Le métabolisme astrocytaire et différents signaux hormonaux contrôlent la synthèse et la dégradation du glycogène (figure 36).

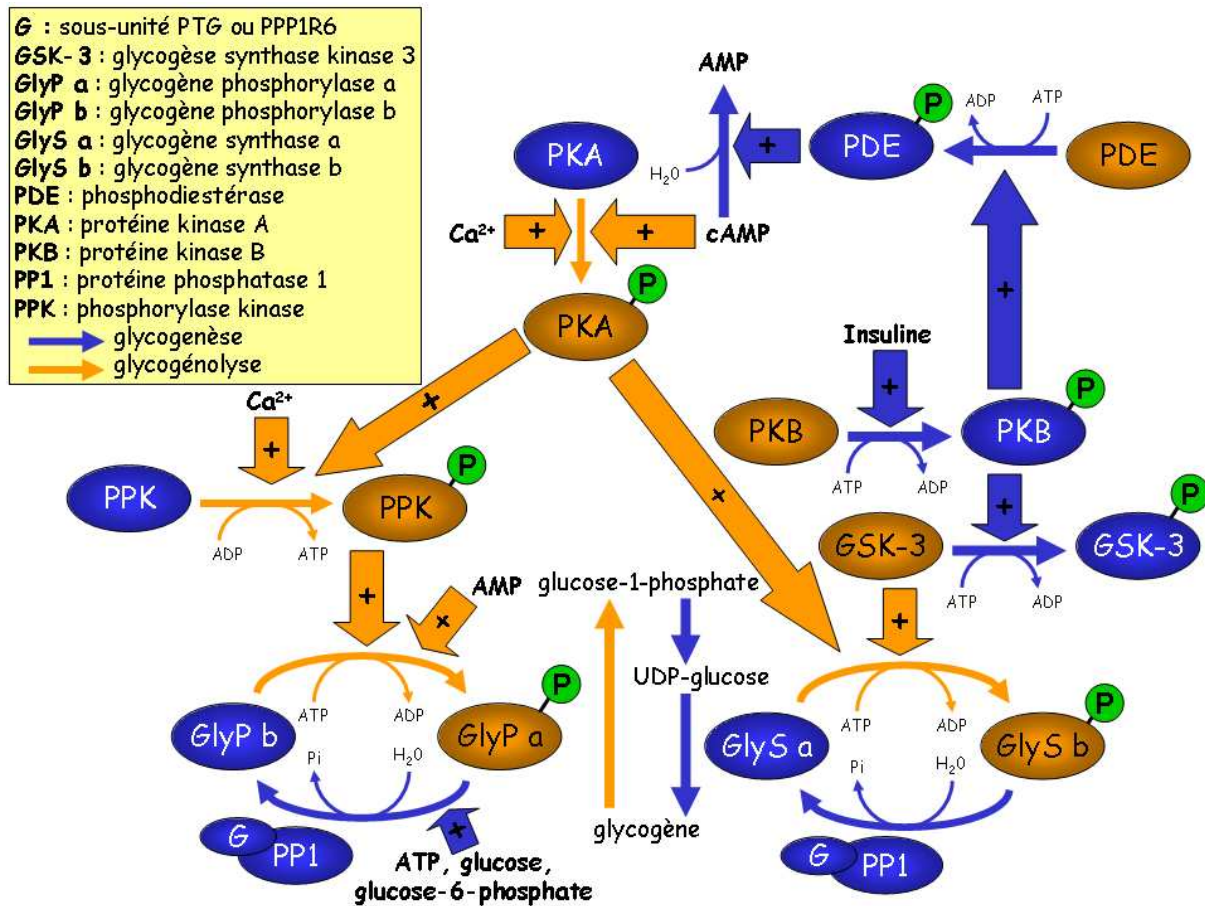


Figure 36 : Mécanismes cérébraux de régulation de la glycogénèse et de la glycogénolyse

La GlyS et la GlyP ont chacune une forme a (GlySa et GlyPa) et une forme b (GlySb et GlyPb) qui sont respectivement actives et inactives. La régulation entre l'état actif et l'état inactif pour ces deux enzymes se fait grâce à un équilibre entre un état phosphorylé et un état déphosphorylé. La GlyPa est phosphorylée tandis que la GlySa est déphosphorylée. La phosphorylation est réalisée par deux jeux différents de kinases pour la GlyP et la GlyS, même si la protéine kinase A (PKA) intervient pour les deux enzymes. La phosphatase PP1

catalyse quant à elle aussi bien la phosphorylation de la GlyP que celle de la GlyS. Elle est associée au niveau cérébral à une des deux sous-unités G possibles, PTG (PPP1R5) ou PPP1R6, ainsi qu'à la PKA, la GlyS, la GlyP et au glycogène (Newgard *et al.*, 2000).

Il existe trois niveaux de régulation des états phosphorylés et déphosphorylés : les hormones, les seconds messagers et les molécules énergétiques. Au niveau hormonal, la fixation par exemple de la noradrénaline sur des récepteurs astrocytaires adrénérgiques déclenche une cascade de réactions qui entraîne entre autre l'activation de la GlyP et la diminution du glycogène astrocytaire (Wiesinger *et al.*, 1997). Au niveau des seconds messagers, des études ont démontré la diminution du glycogène par l'augmentation de l'AMPc et des ions Ca^{2+} (Folbergrová, 1980). Le troisième niveau de régulation est effectué par les produits ou les substrats énergétiques. Ainsi, la GlyP possède différentes susceptibilités à plusieurs régulateurs allostériques : activée par l'AMP et inhibée par l'ATP, le glucose et le glucose-6-phosphate (Crerar *et al.*, 1995 ; Johnson, 1992 ; Lowry *et al.*, 1967).

IV.B.3 - La voie des pentoses-phosphate

Une des principales fonctions de cette voie est de produire de l'énergie sous forme de NADPH à partir du glucose-6-phosphate (figure 37).

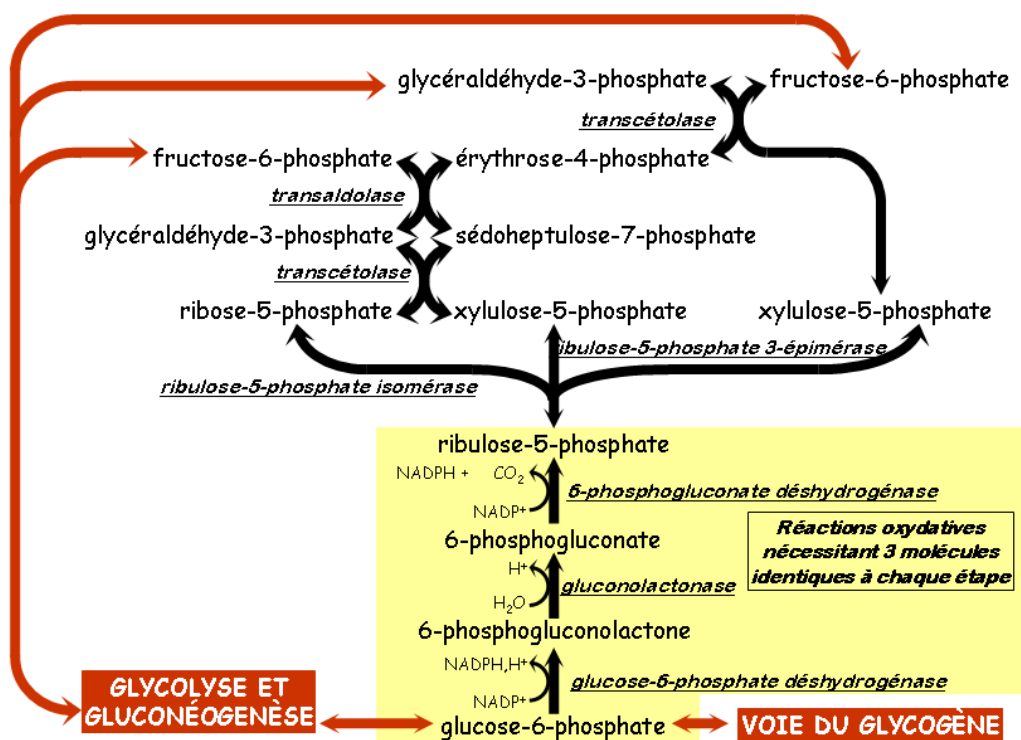


Figure 37 : Voie des pentoses phosphate

Deux phases constituent cette voie. La phase oxydative permet d'abord de transformer le glucose-6-phosphate en ribulose-5-phosphate et de produire 2 molécules de NADPH par molécule de glucose-6-phosphate. Cette phase est irréversible, contrairement à la seconde phase, la phase non-oxydative. Trois molécules de ribulose-5-phosphate sont nécessaires pour obtenir *in fine* 2 molécules de fructose-6-phosphate et une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate. Ces trois dernières molécules peuvent ensuite intégrer les voies de la glycolyse et de la gluconéogenèse.

Certains intermédiaires sortent du cycle pour permettre la biosynthèse de différentes molécules. Par exemple, l'érythrose-4-phosphate est donc un précurseur des acides aminés aromatiques phénylalanine et tyrosine et ainsi que du ribose-5-phosphate qui conduit à la synthèse d'acides nucléiques.

V - La glycosylation

V.A - La glycosylation chez les mammifères

Les monosaccharides constituent une des principales classes de molécules biologiques. Dans l'organisme, ils peuvent être libres, notamment pour participer au métabolisme énergétique, ou associés pour former des glycoconjugués. Ces derniers sont des molécules complexes parmi lesquelles se distinguent les glycoprotéines, les glycolipides et les protéoglycannes. Les glycoprotéines et les glycolipides résultent d'une liaison covalente entre un mono-, oligo- ou polysaccharide, qui prend alors le nom de glycane, et des lipides pour les glycolipides, ou des protéines pour conduire aux glycoprotéines. Les protéoglycannes résultent de l'association d'une protéine et d'un glycosaminoglycane qui est une répétition d'un disaccharide contenant au moins un monosaccharide aminé. Contrairement aux glycoprotéines et aux glycolipides, les protéoglycannes sont exprimés uniquement à l'extérieur des cellules, soit à leurs surfaces, soit dans la matrice extracellulaire.

Les monosaccharides ont le plus souvent une fonction précise qui dépend de leur présence et de leur enchaînement dans le glycane. Les monosaccharides constituant les principaux glycannes des glycolipides et des glycoprotéines sont présentés en figure 38.

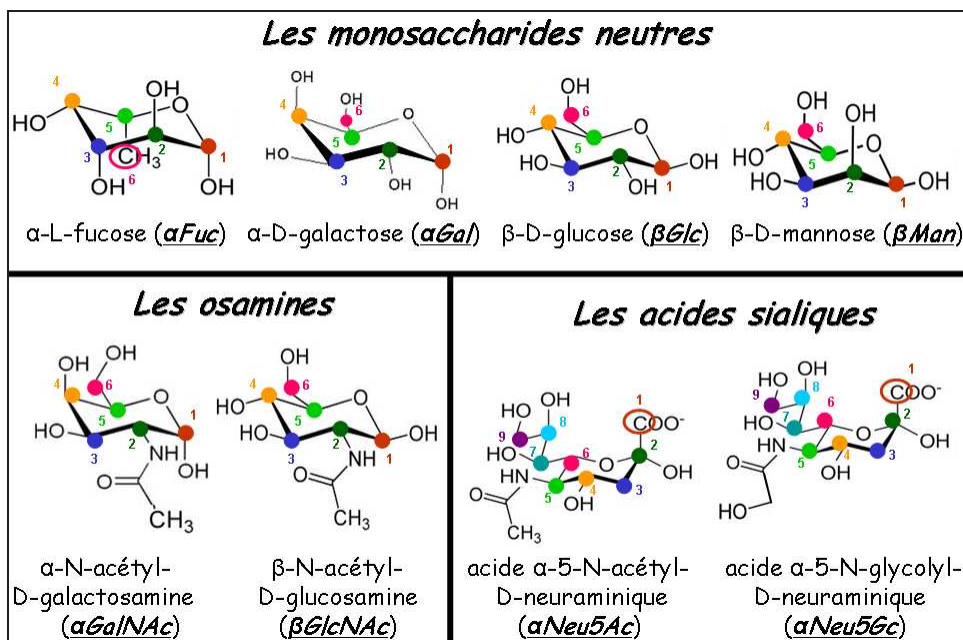


Figure 38 : Monosaccharides les plus représentés chez les mammifères avec leurs abréviations (nomenclature internationale) et la numérotation des carbones de la chaîne principale

Les sucres possèdent plusieurs carbones asymétriques, conduisant à une grande variabilité structurale, comme le glucose et le mannose différant uniquement par l'asymétrie du carbone 2 (figure 38). La position de l'oxygène sur le dernier carbone asymétrique (par

exemple le carbone 5 pour le Glc) détermine la série, D ou L, à laquelle appartient le monosaccharide. Enfin, une isomérisie supplémentaire est présente lorsque le monosaccharide est sous forme cyclique. Il s'agit de l'anomérisie, qui peut être α ou β , déterminée sur le premier carbone lié à l'oxygène du cycle (par exemple le carbone 1 pour le Glc ou le carbone 2 pour le Neu5Ac).

Tous les monosaccharides ne sont pas forcément présents chez une espèce donnée. Ainsi, le L-rhamnose n'est pas un composant des glycanes des animaux et l'acide céto-déoxynonulosonique, un acide sialique, n'est présent que chez les bactéries. De même, chaque monosaccharide entrant dans la composition des glycoconjugués appartient à une seule série, le plus souvent à la série D (comme les Gal, Glc, Neu5Ac) et rarement à la série L (comme le Fuc).

L'hétérogénéité structurale des glycanes résulte de différents paramètres : nature des monosaccharides, anomérisie, type de liaisons et de branchements, substitution par des groupes anioniques (sulfate, phosphate, acétate). Alors qu'il n'y a que 400 possibilités différentes dans l'enchaînement de deux acides aminés (20 acides aminés différents avec un seul type de liaison possible), l'association de deux monosaccharides produit au minimum 1728 possibilités. Les 12 monosaccharides les plus courants peuvent avoir une des deux anomérisies (soit 24 monosaccharides différents) et il existe au minimum 3 types de liaisons possibles entre deux monosaccharides (Gupta *et al.*, 2010). De plus, ces composés se présentent généralement sous la forme de mélanges complexes d'homologues (glycoformes) et d'isomères (glycomères).

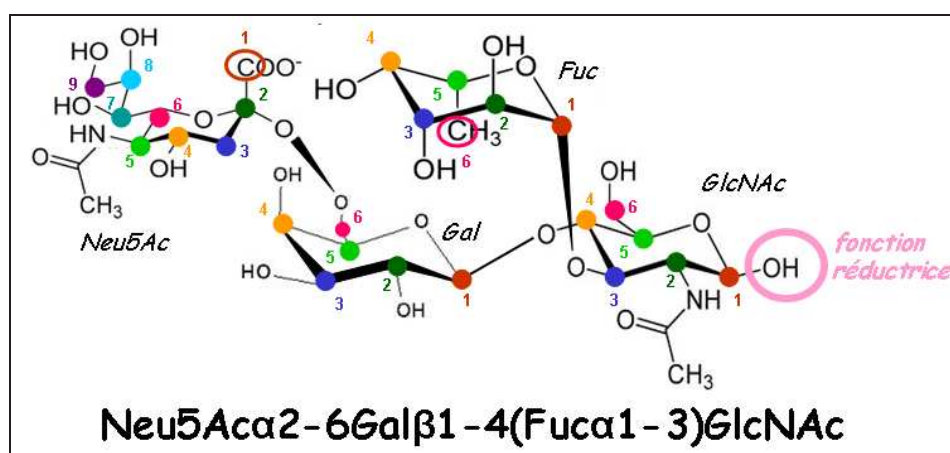


Figure 39 : Nomenclature d'un oligosaccharide, l'antigène LewisX sialylé

La composition des glycanes est donnée de manière conventionnelle en commençant par le monosaccharide situé en position non réductrice (figure 39). Les liaisons entre les monosaccharides se définissent d'abord par l'anomérisie du monosaccharide du côté non réducteur, puis par le numéro du carbone engagé dans la liaison pour ce monosaccharide et enfin par le numéro du carbone engagé dans la liaison pour le monosaccharide suivant (côté réducteur).

V.B - Les glycoprotéines

La glycosylation est une des plus importantes modifications post-traductionnelles. Elle consiste en l'ajout d'oligosaccharides sur certains acides aminés. Deux familles de glycannes composent majoritairement les glycoprotéines : les O- et N-glycannes. Les N-glycannes sont issus de la N-glycosylation, qui conditionne l'addition d'un oligosaccharide sur la chaîne latérale d'un acide aminé, principalement l'asparagine, alors que les O-glycannes sont issus de l'addition de monosaccharides dont le premier est lié à un résidu hydroxylé, préférentiellement la sérine ou la thréonine (Morelle *et al.*, 2007 ; Pratt et Bertozzi, 2004).

V.B.1 - Les O-glycannes

La O-glycosylation se fait par additions successives de monosaccharides. Les principaux monosaccharides rencontrés et constituant les O-glycannes correspondent aux GalNAc, GlcNAc, Gal, Glc, Fuc, Man, Neu5Ac et Neu5Gc. Il existe différents types de liaisons pour les O-glycoprotéines en fonction de la nature du glycanne et de l'acide aminé engagé (tableau 4).

Tableau 4 : Premiers monosaccharides constituant les différents O-glycannes présents chez les mammifères

acide aminé	premier monosaccharide	exemple de glycoprotéine
sérine ou thréonine	Fuc	BA11 (protéine inhibitrice de l'angiogenèse et spécifique au cerveau)
sérine ou thréonine	GalNAc	mucine
sérine ou thréonine	GlcNAc	nucléoporine
sérine ou thréonine	Man	α -dystroglycane
sérine	D-xylose	glypican
tyrosine	Glc	glycogénine
hydroxylysine	Glc	collagène

Le premier résidu reste cependant dans la majorité des O-glycosylations un GalNAc (O-glycane de type mucine). Des monosaccharides vont s'ajouter au GalNAc pour former dans un premier temps le squelette (appelé "core") correspondant à l'un des motifs ci-dessous (figure 40).

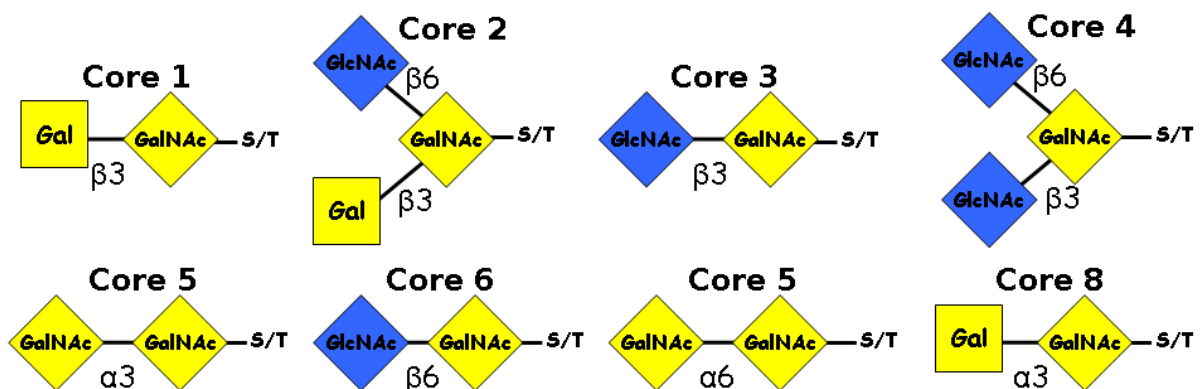


Figure 40 : Les 8 motifs des O-glycannes commençant par un GalNAc.

S : sérine, T : thréonine

Des monosaccharides supplémentaires sont ajoutés par différentes enzymes à ces motifs pour que les glycoprotéines acquièrent leurs fonctions finales. La taille de ces O-glycannes reste cependant limitée dans la plupart des structures à six monosaccharides.

V.B.2- Les N-glycannes

Le schéma général de la synthèse et de la maturation des N-glycannes qui se déroulent dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi est présenté en figure 41.

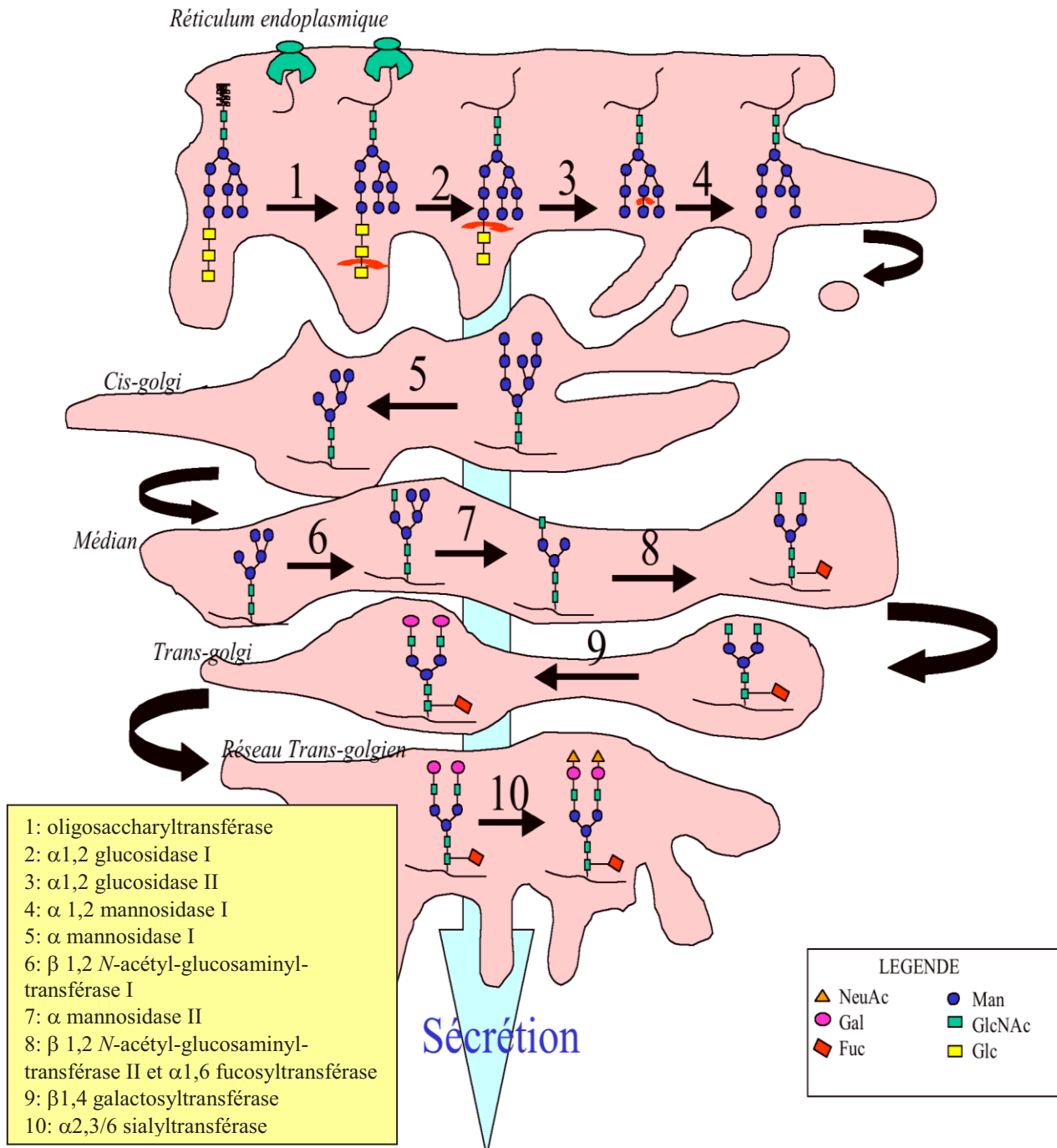


Figure 41 : Maturation des N-glycoprotéines (Kornfeld et Kornfeld, 1985)

La synthèse de l'oligosaccharide transféré sur la protéine est effectuée préalablement sur la face cytosolique du réticulum. L'étape à laquelle se fait l'arrêt de la maturation détermine la nature finale du N-glycane (figure 42).

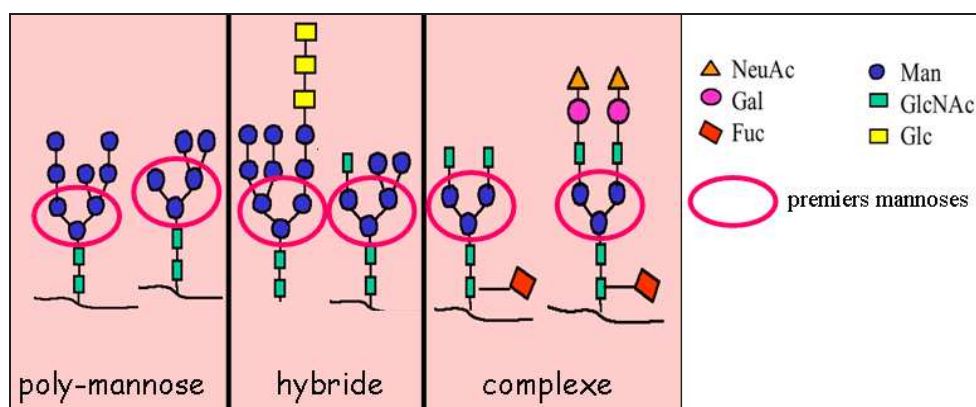


Figure 42 : Exemples de formes de N-glycannes

Les premiers Man des N-glycannes (figure 41) peuvent avoir plusieurs branchements, conduisant à une multiplication des antennes du N-glycane. Celui-ci peut être bi-, tri-, tetra- ou encore penta-antenné et chaque antenne peut présenter un enchaînement de monosaccharides différent afin de moduler la fonction du glycane.

V.B.3 - Principales fonctions des O- et N-glycannes

Ainsi la présence de glycannes sur une protéine peut moduler sa structure tridimensionnelle, ses propriétés physicochimiques, la protéger contre les attaques protéolytiques ou, au contraire, permettre sa maturation en contrôlant le site de coupure protéolytique nécessaire à la production d'une glycoprotéine biologiquement active. Enfin, les glycannes peuvent aussi masquer des épitopes peptidiques et leurs modifications peuvent avoir une influence sur la durée de vie et le degré d'immunogénicité des protéines qui les portent.

Les glycannes sont également impliqués dans le routage intracellulaire de glycoprotéines néosynthétisées et dans l'endocytose de glycoconjugués *via* des protéines spécifiques présentes dans les membranes de toutes les cellules. Ils participent à la glycosylation de surface de la cellule.

V.C - La glycosylation de surface

Inbar et Sachs furent parmi les premiers à mettre en évidence la glycosylation de surface en observant des modifications de glycoconjugués sur des cellules transformées par rapport aux cellules normales correspondantes (Inbar et Sachs, 1969). La glycosylation de surface est formée par des glycannes appartenant à des glycolipides ou à des glycoprotéines.

V.C.1 - Les glycolipides

Les glycolipides peuvent appartenir à la famille des sphingolipides, des glycérolipides ou des glycérophospholipides mais seuls les sphingolipides et les glycérophospholipides font

partie, avec les stérols, des trois familles de lipides exprimées à la surface des cellules (van Echten-Deckert et Gurgui, 2008).

Les glycérolipides possèdent un ou deux acides gras et jusqu'à 4 monosaccharides, dont un glycérol. La plupart ne contiennent qu'un seul monosaccharide, essentiellement du Gal ou du 6-sulfo-6-déoxyglucose. Le Gal et les autres monosaccharides peuvent être également modifiés par des groupements phosphates ou sulfates (LIPID MAPS, 2011).

Les glycanes des sphingolipides ont une structure proche des O-glycanes des glycoprotéines avec des structures riches en Gal, GalNAc et Neu5Ac et contenant rarement plus de 6 monosaccharides. La différence par rapport aux O-glycanes se fait essentiellement au niveau des liaisons et au niveau du monosaccharide lié au lipide, qui est souvent β Glc (van Echten-Deckert et Gurgui, 2008). La biosynthèse de ces glycosphingolipides a parfaitement été décrite (figure 43).

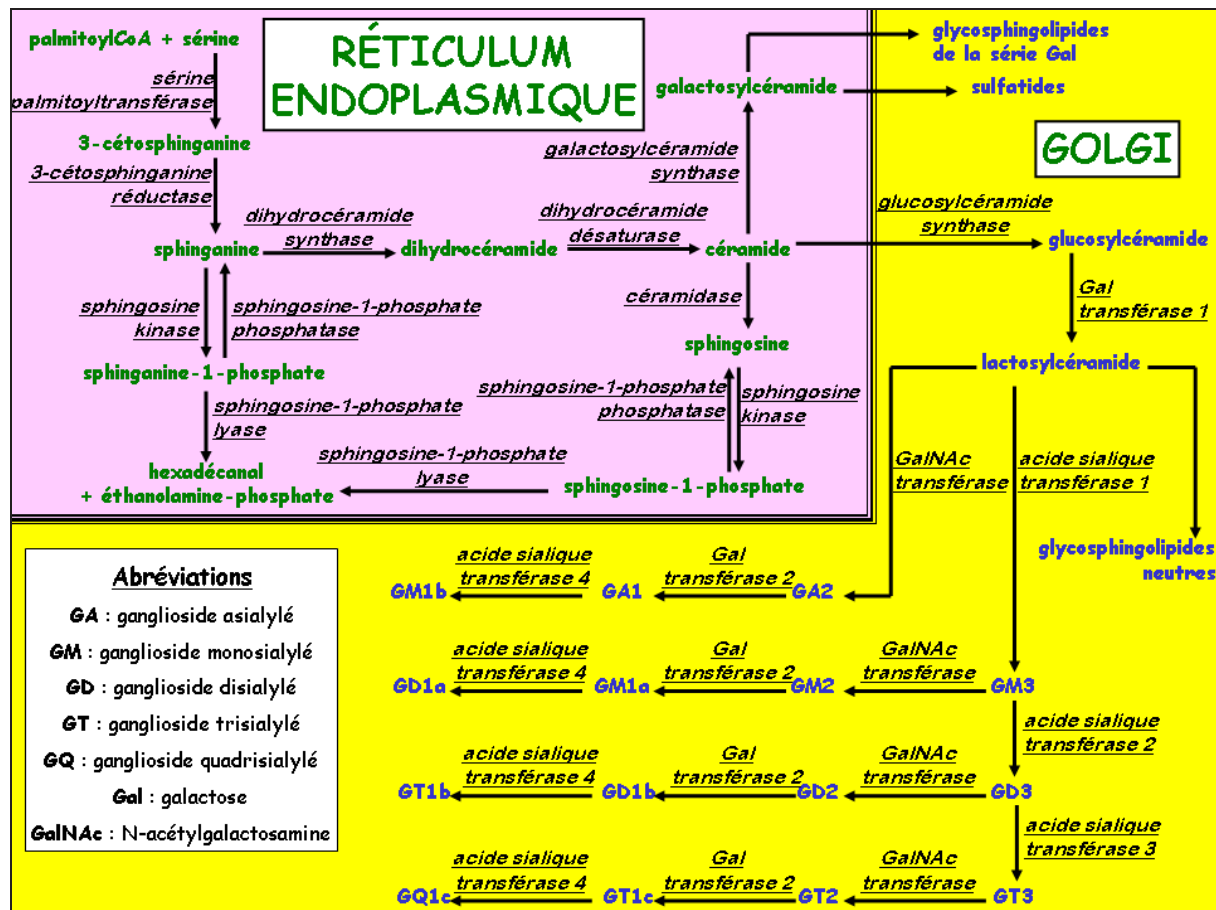


Figure 43 : Biosynthèse des glycosphingolipides (van Echten-Deckert et Gurgui, 2008)

À ces structures de bases peuvent s'ajouter d'autres monosaccharides tels que le Fuc, augmentant ainsi la complexité de la signalisation à la surface de la cellule.

V.C.2 - Rôle de la glycosylation de surface

Les glycoconjugués jouent un rôle très important dans la vie sociale des cellules et des tissus : leur antigénicité est connue et se traduit notamment par des phénomènes d'incompatibilité entre les groupes sanguins (Rudd *et al.*, 2004). Leur expression peut être modifiée en fonction de la différenciation et de la transformation cellulaires et certains antigènes oligosaccharidiques ont ainsi acquis le statut d'antigènes de différenciation et/ou d'antigènes associés aux cancers (Dube et Bertozzi, 2005). Ils sont par exemple impliqués dans l'adhésion des agents infectieux, comme le virus de l'influenza (Miller *et al.*, 2005). Les réactions inflammatoires (sélectines) ou encore l'adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales, étape préalable à la création d'un foyer métastatique dans un organe particulier (Fuster et Esko, 2005).

Toutes ces propriétés ont servi de base au développement de vaccins ou de traitements pour différentes maladies. De plus, des glycoconjugués peuvent être utilisés pour inhiber certaines reconnaissances cellulaires, comme l'adhésion de cellules tumorales à des cellules saines, limitant ainsi la diffusion de métastases, mais aussi pour annihiler la fixation de pathogènes sur les cellules hôtes (Seeberger et Werz, 2007). Sur ce même principe, des vaccins contiennent des glycoconjugués exprimés à la surface des cellules bactériennes.

V.D - Les principales techniques d'analyse des glycannes

Les méthodes d'analyse structurale des glycannes se basent sur l'emploi de quatre grandes techniques : la chromatographie, l'électrophorèse capillaire, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire.

L'avènement à la fin des années 70 de la Chromatographie Liquide Haute Pression (**HPLC**) a donné un essor considérable à la purification des glycannes du fait de la rapidité d'analyse et de la très grande sensibilité de la technique. De plus, de très nombreux supports chromatographiques (colonne de silice, résine échangeuse d'ions...) et solvants d'élution sont actuellement disponibles et permettent de fractionner la plupart des oligosaccharides des glycoprotéines dans un but analytique ou préparatif.

L'introduction de la chromatographie de type HPLC sur résines pelliculaires d'échange d'ions à pH élevé, associée à la détection ampérométrique pulsée (**HPAEC-PAD** : High pH Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection) a considérablement amélioré la séparation et l'analyse des mono- et oligosaccharides. Elle a été appliquée avec succès aussi bien au fractionnement des monosaccharides qu'à celui des oligosaccharides neutres et acides provenant de N-glycoprotéines, de mucines ou de glycolipides. De plus, l'HPAEC-PAD a l'avantage de détecter des oligosaccharides avec une très forte sensibilité (10pmol) et de séparer des oligosaccharides ne différant entre eux que par un seul type de liaison entre deux unités. Cette méthode quantitative nécessite néanmoins l'injection d'un standard pour toute analyse. Elle ne peut donc pas être utilisée pour déterminer derechef l'enchaînement d'un oligosaccharide.

Plus récemment, l'**électrophorèse capillaire** est apparue comme une technique très prometteuse pour l'analyse des mono- et oligosaccharides. Cette méthode implique la migration des glycannes en fonction de leurs mobilités apparentes, c'est-à-dire en fonction de

leurs charges et de leurs masses moléculaires, dans un champ électrique en utilisant une colonne capillaire.

La **spectrométrie de masse (MS)** est utilisée depuis de nombreuses années pour l'analyse structurale des glycannes, notamment pour la détermination de la composition en monosaccharides de polysaccharides. Cette méthode est très sensible et reproductible. En revanche, sa mise en place nécessite de lourds investissements en équipement et en expertise. De plus, certaines précisions concernant notamment les anoméries et les points de branchement ne peuvent pas être résolues par cette seule technologie (Kawasaki *et al.*, 2005).

Enfin, la structure primaire des oligosaccharides a pu être déterminée par la méthode de Résonance Magnétique Nucléaire (**RMN**). Cette technique permet de voir les atomes d'une même espèce (^1H , ^{13}C , ^{31}P) quand ils entrent en résonance pour définir la stéréochimie des molécules, qui n'est pas déterminable par MS. Parfois la RMN1D n'est pas assez résolutive et il faut utiliser la RMN2D. Cette première étape reste néanmoins indispensable pour obtenir les premières informations, comme les déplacements chimiques des principaux atomes. Elle permet de déterminer la structure primaire complète, incluant la définition des anoméries alpha, bêta et des liaisons glycosidiques. De plus, l'analyse en RMN n'est pas destructrice et les échantillons sont récupérables.

Toutes ces méthodes d'analyses présentent néanmoins l'inconvénient majeur de ne pas tenir compte du rôle physiologique des glycannes. En effet, les glycannes peuvent être accessibles ou non aux autres molécules suivant leurs fonctions. Ils peuvent ainsi servir à structurer une glycoprotéine, et ils sont alors le plus souvent inaccessibles, ou bien à l'inverse être très accessibles pour permettre l'interaction avec une autre molécule. La différence entre ces glycannes accessibles et inaccessibles est importante dans le cadre d'une étude portant sur le rôle physiologique de la glycosylation. En effet, les glycannes accessibles peuvent intervenir dans la signalisation cellulaire. Cette information sur l'accessibilité est perdue lors de l'utilisation des techniques ci-dessus car la partie glycanique est isolée du reste du glycoconjugué. C'est pourquoi une approche alternative permettant l'étude plus spécifique des glycannes accessibles a été choisie. Cette approche repose sur l'utilisation de protéines appartenant à une même famille et reconnaissant spécifiquement les glycannes : les lectines.

V.E - L'utilisation de lectines pour l'analyse des glycannes

Dès 1887, les premières études ont porté sur des extraits toxiques de *Ricinus communaris* dans lesquels se trouvaient une molécule appelée hémagglutinine (Assmann, 1911 ; Dixon, 1887). D'autres lectines ont ensuite été découvertes, comme la concanavaleine A en 1935 (Sumner *et al.*, 1935), mais il faut attendre 1968 pour que la première lectine de mammifère soit découverte (Morell *et al.*, 1968). Depuis, les connaissances sur cette famille de protéines n'ont cessé de progresser.

V.E.1 - Présentation des lectines

Le terme de lectine, introduit il y a une quarantaine d'années, définit une catégorie de protéines capables de choisir (du latin, *legere*, *lectus*) un type cellulaire particulier en fixant sélectivement et de manière réversible des glycannes libres ou conjugués. Une définition généralement admise des lectines a été donnée en 1980 (Goldstein *et al.*, 1980) et précise

qu'une lectine est une protéine ou une glycoprotéine d'origine non immune et sans activité enzymatique, fixant ou agglutinant des glycannes et/ou cellules. Elles constituent donc des outils précieux pour reconnaître/isoler des glycannes et des glycoconjugués et pour obtenir des informations sur la structure de ces derniers, en établissant des profils glycanniques, qu'ils soient libres ou intégrés dans les systèmes cellulaires.

Les lectines sont universellement répandues et sont présentes aussi bien chez les micro-organismes (PA-I, lectine de *Pseudomonas aeruginosa*) que chez les végétaux (LEA, lectine extraite de la tomate *Lycopersicon esculentum*) et les animaux (HPL, lectine du placenta humain). Les lectines utilisées pour isoler les glycannes et pour explorer leur structure sont d'origines diverses, mais pour le moment le plus souvent végétales et plus rarement animales.

Cette famille de protéines possède également une grande diversité de structures tridimensionnelles entre ses membres. Les lectines décrites sont parfois des mélanges d'isolectines qui se différencient par mesure du point isoélectrique ou par la spécificité. Une lectine tétramérique avec deux formes de sous-unités (par exemple A et B), peut être en réalité un mélange de cinq isolectines (A4, A3B1, A2B2, A1B3 et B4).

La spécificité des lectines est définie par les oses capables d'inhiber les phénomènes d'agglutination (Quétard *et al.*, 1998). Certaines lectines interagissent avec la plupart des glycannes alors que d'autres lectines ne reconnaissent qu'un enchaînement de disaccharides avec une sélectivité supplémentaire dans le type de liaison (anomérie et position, par exemple α 1-6). Même si une lectine reconnaît plusieurs structures, il existe le plus souvent une structure préférentielle, majoritairement disaccharidique. Cette interaction, dont l'affinité est de l'ordre du micromolaire, reste cependant faible par rapport à l'affinité de l'interaction antigène/anticorps, qui est de l'ordre du nanomolaire (Gupta *et al.*, 2010).

V.E.2 - Propriétés des lectines

Les fonctions des lectines ne sont pas encore toutes complètement élucidées. Toutefois, leur implication dans des phénomènes biologiques majeurs ne fait aucun doute. Elles interviennent dans la reconnaissance cellulaire, le trafic intracellulaire et de nombreux arguments suggèrent que les lectines jouent un rôle de défense chez les plantes contre divers organismes et en particulier les insectes. En effet, le tube digestif des insectes est riche en récepteurs cellulaires potentiels des lectines, et des effets néfastes (retard de croissance, anomalies de développement...) peuvent faire suite à l'ingestion de plantes contenant des lectines (Rüdiger et Gabius, 2001).

En outre, plusieurs types cellulaires, dont les macrophages, ont permis de mettre en évidence l'implication des lectines dans le phénomène d'endocytose. Ce processus est à la base du développement d'agents thérapeutiques tels que des protéines glycosylées pouvant pénétrer plus aisément dans une population cellulaire donnée. Cette approche de ciblage vise par exemple à épargner les cellules saines dans une thérapie anti-tumorale.

V.E.3 - Les lectines comme outils d'analyse des glycannes

L'utilisation de lectines présente notamment l'avantage de ne pas détruire l'échantillon et de pouvoir cibler jusqu'à l'anométrie dans l'enchaînement des monosaccharides. Les lectines constituent des outils précieux d'analyse et sont utilisées à ces fins selon différentes méthodologies.

V.E.3.a - La chromatographie d'affinité

Cette technique est principalement utilisée pour l'étude des glycoprotéines et leurs purifications. La lectine est fixée sur la phase stationnaire et les glycoprotéines à purifier ou à séparer sont injectées dans la colonne. L'élution spécifique des glycoconjugués est réalisée le plus souvent par un saccharide reconnu par la lectine. L'utilisation de lectines reconnaissant un large spectre de glycannes différents permet d'étudier simultanément un mélange de protéines. Des glycoprotéines ou des glycopeptides peuvent être séparés des protéines et des peptides non glycosylés par chromatographie d'affinité sur une lectine préalablement définie. Après une déglycosylation chimique ou enzymatique de la fraction retenue, l'injection du mélange en chromatographie liquide (LC) permet d'identifier les glycoprotéines ou les glycopeptides retenus sur la colonne d'affinité (Fan *et al.*, 2004 ; Jiang *et al.*, 2008).

La purification d'une glycoprotéine est aussi possible par chromatographie d'affinité. Ainsi, les immunoglobulines A (IgA) sont purifiées par chromatographie d'affinité grâce à leur O-glycosylation (Hiki *et al.*, 2001). L'utilisation des lectines et notamment de HAA (agglutinine d'*Helix aspersa*) a conduit à une meilleure compréhension de la néphropathie liée à l'IgA, cette maladie étant corrélée à une modification du O-glycane de l'IgA (Hiki, 2009).

V.E.3.b - Le marquage par les lectines

Selon cette méthode, les lectines sont couplées à des conjugués qui peuvent être détectés directement ou indirectement. Un marquage de la lectine avec un fluorophore tel que la fluorescéine permet une lecture sans réaction supplémentaire autre que la reconnaissance saccharide/lectine. La lectine peut à l'inverse être couplée à des molécules, telles que la biotine. Une réaction secondaire avec des composés tels que l'avidine-peroxydase est ainsi nécessaire. Un substrat de la peroxydase est alors utilisé pour révéler l'interaction saccharide/lectine.

Les cellules immortalisées ou des coupes tissulaires peuvent être marquées par des lectines couplées à des conjugués. Les lectines reconnaissent des structures glycaniques spécifiques dans ou à la surface des cellules. Les lectines peuvent être utilisées pour marquer un type cellulaire précis pour le différencier des autres types cellulaires ou pour identifier un état précis de la cellule (Rosell *et al.*, 2009).

Les lectines peuvent, avec le même type d'approche, permettre un marquage spécifique de certaines glycoprotéines après un transfert sur membrane en Western blot (Watanabe *et al.*, 2009). L'évolution de la glycosylation peut ainsi être suivie en fonction des conditions expérimentales.

V.E.3.c - Les puces à lectines

Les puces à lectines permettent d'obtenir rapidement une quantité importante d'informations sur la composition glycanique de l'échantillon étudié, qui peut être aussi bien un glycoconjugué qu'une cellule vivante. Cette technique est à rapprocher de la puce à ADN pour la génomique et de l'électrophorèse 2D pour la protéomique. Le principe repose sur la fixation sous forme de micro-spots de différentes lectines sur un support. L'analyse d'un échantillon peut ainsi être réalisée sur un grand nombre de lectines, permettant une étude complète et simultanée de différentes structures glycaniques.

Certaines pathologies, telles que le cancer, entraînent des variations de glycosylation qui peuvent être multiples et différentes en fonction du type de cellules tumorales. Les puces à lectines constituent donc un outil approprié pour l'élucidation de ces différences glycaniques au niveau protéique (Ito *et al.*, 2009). La glycosylation de surface pouvant elle aussi être affectée dans le cas de pathologies, la technique a été adaptée afin d'étudier l'expression des glycanes à la surface cellulaire (Tao *et al.*, 2008).

L'échantillon est déposé sur les lectines puis l'interaction avec les lectines est révélée, le plus souvent par fluorimétrie. L'interaction de l'échantillon avec les lectines est enregistrée par un détecteur et un programme informatique traite les résultats pour obtenir des intensités d'interaction (figure 44). Les différentes intensités forment le profil glycanique, qui constitue une signature propre au glycoconjugué analysé.

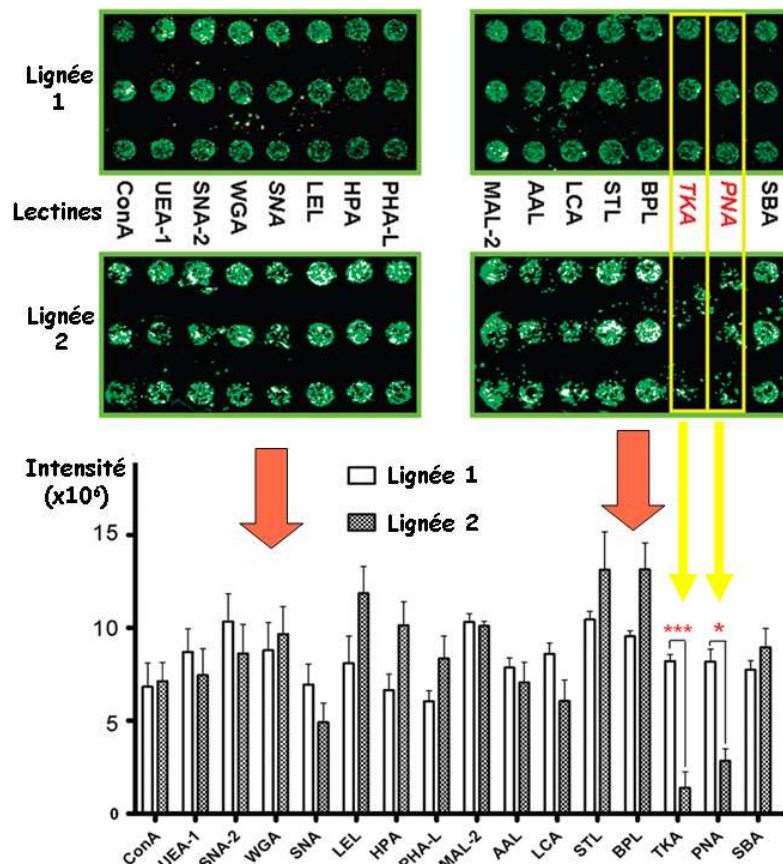


Figure 44 : Profil glycanique de deux lignées cellulaires par puce à lectines réalisé en triplicata. L'intensité de fluorescence est mesurée à partir de la puce à lectines (en haut) et le graphique (en bas) représente la moyenne des 3 valeurs. (He *et al.*, 2010).

Cette technique est très utile pour des études de première intention car elle permet d'avoir rapidement des informations sur la composition en glycane de l'échantillon pour pouvoir orienter les analyses suivantes (He *et al.*, 2010). De plus, l'étude peut être réalisée sur des cellules vivantes qui seront récupérées par la suite pour une remise en culture. La différence de profil au niveau de certaines lectines peut être exploitée pour poursuivre l'étude avec d'autres techniques, comme la chromatographie d'affinité avec des lectines.

V.E.3.d - La technique GLYcoDiag

La stratégie proposée par GLYcoDiag repose sur l'utilisation de lectines qui, au lieu d'être fixées sur un support, sont fixées au fond de puits de microplaques (Landemarre et Duverger, 2011). Cette technique, semblable à la puce à lectines, permet de mettre en évidence des structures glycaniques précises et d'indiquer la présence de modifications par rapport à des structures de référence. La panoplie de lectines peut cependant être plus facilement changée par rapport aux puces grâce à l'utilisation de plaques modulables (12 colonnes de 8 puits interchangeables). Le choix adapté du mode de révélation permet une étude aussi bien des glycoconjugués que des cellules vivantes. La technique facilite en outre l'utilisation de composé quantifiable par absorbance pour la révélation.

Ainsi, les structures glycaniques peuvent être étudiées en temps court (deux heures) et avec un équipement de base très simple (plaque 96 puits). Cette approche ne se substitue pas à l'analyse structurale mais elle est complémentaire et particulièrement adaptée pour une analyse de première intention comme celle qui doit être menée dans le cadre de cette thèse.

V.F - Objectifs de l'étude de la glycosylation

Plusieurs études ont montré le rôle de la glycosylation dans la signalisation cellulaire. Le choix des lectines utilisées est donc en partie réalisé en fonction des glycannes qui ont déjà été impliqués dans la régulation des voies métaboliques glucidique ou glutamatergique. C'est ainsi le cas du O-GlcNAc (GlcNAc lié à une sérine) qui module l'activité de la GSK-3 (Wang *et al.*, 2007b), et indirectement la synthèse de glycogène (figure 36). Il a également été démontré que certaines molécules, comme l'éthanol, modifiaient la glycosylation de surface des neurones (Braza-Boïls *et al.*, 2006).

Concernant notre étude, le but consiste à identifier des variations de glycosylation révélées par des modifications de l'interaction avec une ou plusieurs lectines et de poursuivre l'étude avec cette ou ces lectines. D'une part, les échantillons protéiques doivent contenir un maximum de glycoprotéines, ce qui les rend très complexes. D'autre part, le glycoprofil de nos cellules en culture primaire n'avait jamais été réalisé. Des mises au point ont donc été nécessaires pour l'étude des glycoprotéines et de la glycosylation de surface. Plusieurs méthodes ont ainsi été testées avant que des conditions optimales ne soient déterminées puis utilisées pour obtenir les résultats présentés dans ce chapitre.

Matériel et méthodes

I - Les réactifs

Ceux-ci sont donnés dans le tableau page 12.

II - Les animaux

Pour chaque expérimentation menée, les souris utilisées ont un niveau de sélection identique (présenté en introduction générale pages 26 à 29) entre les lignées MSO-Slow et MSO-Fast. Quel que soit le nombre de croisements consanguins dont sont issues les souris (entre 5 et 7), les souris sont considérées comme consanguines avec des caractères génétiques quasiment fixés. Les souris, mâles et femelles confondus, sont âgées de $78,2 \pm 21,6$ jours au moment de l'expérience.

Les souris sont élevées à une température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ avec une luminosité artificielle par néon de 7h30 à 19h30. L'eau et la nourriture sont accessibles *ad libitum*. Les expérimentations sont menées à la même lumière artificielle et à la même température que celle des box d'élevage.

Chaque étude a été menée de manière éthique en respectant la Directive du Conseil Européen du 24 novembre 1986 (86/609/ECC) avec l'autorisation du comité éthique local (agrément CREEA n°CL2007-023).

III - Injections de la méthionine sulfoximine

La MSO est d'abord dissoute dans du sérum physiologique (solution 0,9% NaCl) à 7,5mg/ml pour une dose de 75 mg/kg ou à 20mg/ml pour une dose de 200mg/kg.

Les souris MSO-Fast reçoivent une dose de 75mg/kg tandis que les MSO-Slow reçoivent une dose de 75mg/kg ou de 200mg/kg. Comme le montre les résultats précédents (figures 16 et 17, pages 54 et 55), la dose de 75mg/kg est subconvulsivante pour les MSO-Fast mais ne provoque que peu d'effet chez les souris MSO-Slow. Aucune dose n'étant subconvulsivante chez MSO-Slow, celle à 200mg/kg apparaît comme un bon compromis car toutes les souris atteignent en effet le stade IV (stade précédant les convulsions généralisées) sur l'échelle de Racine (Racine, 1972). Un fort taux de survie dans le temps est également observé à cette dose, contrairement aux souris injectées à 350mg/kg dont le taux de mortalité est de 60% à 10 heures.

Toutes les injections sont réalisées en intra-péritonéal par le même manipulateur, entre 8h et 12h30 pour éviter au maximum l'effet du cycle circadien. Le volume injecté correspond à 10 μ l par gramme de souris et l'utilisation de seringues de 500 μ l permet une précision au 1/2 gramme de souris près.

Les souris témoins utilisées pour cette étude sont injectées dans les mêmes conditions avec du sérum physiologique.

IV - Sacrifice des animaux et récupération du cortex

Les analyses biochimiques cérébrales imposent plusieurs contraintes quant à la méthode de sacrifice des animaux et à la conservation des échantillons. La décapitation est une des trois méthodes éthiques de sacrifice, avec la dislocation de la colonne vertébrale et le four micro-onde, qui n'altère pas les voies cérébrales métaboliques et de signalisation. Le sacrifice par micro-ondes nécessite un équipement adapté et du personnel formé. Le sacrifice par décapitation est privilégié par rapport à la dislocation de la colonne vertébrale. En effet, le glycogène subit une dégradation enzymatique rapide après la mort de l'animal (Hutchins et Rogers, 1970). Afin de réduire au maximum la dégradation du glycogène, les têtes sont immédiatement plongées dans de l'azote liquide après la décapitation.

Des souris sont sacrifiées immédiatement, à 4h, 8h et 24h après l'injection de MSO ou de sérum physiologique. Des souris MSO-Fast sont également sacrifiées à 2h et des souris MSO-Slow à 48h. Pour chaque temps, 10 mâles et 10 femelles sont injectés à la MSO et répartis dans 2 groupes de 3 souris et 2 groupes de 2 souris pour chaque sexe. Ce regroupement a deux avantages :

- Travailler avec un nombre suffisant d'échantillons (n=4 pour chaque sexe).
- Avoir assez de matériel pour faire toutes les analyses sur un échantillon identique.

La dissection des têtes pour la récupération du cortex cérébral est réalisée sur azote liquide suivant la méthode décrite par Glowinski (Glowinski et Iversen, 1966). Après le broyage de tissu à l'aide d'un homogénéiseur à azote liquide, la poudre obtenue est conservée à -20°C. À chaque fois que la poudre est sortie du congélateur, celle-ci est immédiatement placée dans de l'azote liquide. Un contrôle visuel permet de vérifier le bon état de congélation de la poudre.

V - Culture d'astrocytes

V.A - Mise en culture

La méthode, suivant le protocole décrit par Vergé et Hévor (Vergé et Hevor, 1995) avec quelques modifications, consiste à sacrifier des souris nouveau-nés âgés de 1 à 4 jours par décapitation. Ensuite, la tête est épinglée sur un support. Deux incisions sont réalisées successivement d'arrière en avant jusqu'aux yeux. La première pour écarter la peau et la seconde pour écarter la boîte crânienne. A l'aide d'une spatule, le cerveau est prélevé et plongé dans une boîte de Pétri remplie de tampon phosphate salin (PBS, Phosphate 10mM, chlorure de potassium 2,7mM, chlorure de sodium 0,8%, pH 7,4).

Sous microscope, les lobes olfactifs se situant à l'avant du cerveau sont enlevés à l'aide de pinces, puis la fine couche de méninges entourant le cortex cérébral est détachée. Pour terminer, le cervelet et le tronc cérébral sont séparés des hémisphères nous intéressant et ces derniers sont enfin plongés dans 2ml de milieu Eagle modifié par Dubelcco complet (noté

DMEM+ et composé de DMEM avec 10% sérum de veau fœtal inactivé à 52°C pendant 30 minutes, 2mM de L-glutamine et de la pénicilline/streptomycine à 1X).

Les tissus sont lacérés en créant un mouvement d'aspiration-refoulement à l'aide d'un trocart monté sur seringue, puis du DMEM+ est ajouté pour avoir un volume final de 2ml/tête. Les cellules sont dénombrées en cellule de Malassez pour déterminer le volume à mettre dans les boîtes. Enfin, l'ensemencement est réalisé en boîte de Pétri de diamètre 100 avec 4 millions d'astrocytes (dans un volume d'environ 0,6ml) et 7ml de DMEM+ par boîte pour un ensemencement à 73000 astrocytes/cm².

Le milieu est ensuite changé entièrement tous les 7 jours. Les astrocytes arrivent à confluence environ 4 semaines après la mise en culture.

V.B - Ajout de la MSO sur les cultures astrocytaires pour doser le glycogène

Pour une meilleure visibilité de l'effet de la MSO sur la variation de glycogène astrocytaire, il est préférable que les astrocytes aient épuisé leurs réserves de glycogène. L'étude est donc réalisée 7 jours après un changement de milieux (Swanson *et al.*, 1989).

Afin d'obtenir une concentration finale en MSO de 100mM, 72,1mg de MSO sont dissout dans 4ml de PBS stérile. La solution n'est pas filtrée pour être sûr de ne pas perdre de MSO lors d'une éventuelle adsorption sur le filtre. Des dilutions de 1/10 en 1/10 sont ensuite réalisées dans du PBS jusqu'à 100pM, soit 10 fois la dernière concentration de MSO choisie.

La quantité de glycogène est faible dans les astrocytes en culture dans des conditions basales. Pour palier cet inconvénient, trois boîtes sont donc réunies entre elles pour chaque dose de MSO afin d'augmenter la précision par rapport au témoin PBS. Pour chaque concentration de MSO, le milieu des boîtes est renouvelé avec 8ml de DMEM+ et 890µl de MSO 10 fois concentrée (ou du PBS pour les boîtes témoins) sont ajoutés. Un intervalle de 7 minutes est respecté entre chaque mise en présence d'une concentration de MSO sur les cultures afin que de respecter le temps d'incubation lors de la récolte des cellules.

L'incubation dure 7 heures à 37°C. Il a été démontré que cette durée d'incubation permet d'atteindre le potentiel maximal d'accumulation du glycogène pour des cultures astrocytaires de souris sensibles à la MSO, les CBA/J, et un potentiel d'accumulation proche du maximum pour les souris plutôt résistantes, les C57/BL6J (Bernard-Hélary *et al.*, 2002).

V.C - Cultures astrocytaires pour l'étude de la glycosylation de surface

La glycosylation de surface des cellules étant essentiellement formée par les glycolipides et des glycoprotéines, ces deux types de molécules doivent donc être intacts pour que le profil glycannique soit le plus fidèle possible à la glycosylation effective. Le décollement des cellules du support par trypsinisation, technique largement employée, pose problème car l'enzyme employée, la trypsine, est une protéase. À l'inverse, le décollement des cellules par raclage forme des agrégats de cellules qui limitent l'interaction avec les

lectines. Une méthode alternative a donc été utilisée. Les cellules sont d'abord légèrement trypsinisées puis remise en suspension sous agitation, avec ou sans MSO.

Les astrocytes sont récoltés 5 jours après le dernier changement de milieu et 2 boîtes sont nécessaires à la réalisation d'un glycoprofil pour une condition expérimentale. La trypsine agissant à une température optimale de 37°C, l'enzyme et le PBS stérile sont préalablement chauffés à cette température. Le DMEM+ est éliminé des boîtes et celles-ci sont lavées 2 fois avec 5ml de PBS stérile. La trypsine est ensuite déposée sur les astrocytes à raison de 2ml/boîte pendant 5 minutes à 37°C. Les cellules sont alors raclées et la réaction de trypsinisation est arrêtée par l'ajout de 2 ml de DMEM+.

Les 4ml sont déposés dans un tube de 50ml servant à regrouper les cellules de toutes les boîtes, puis ce tube est centrifugé 5 minutes à 1000 g. Le surnageant, contenant la trypsine, est éliminé et le culot est resuspendu dans 8ml de DMEM+. Les cellules sont alors réparties de manière égale dans le nombre de tube de 50ml nécessaire, avec un tube par condition expérimentale. Du DMEM+ est ajouté dans chaque tube qsp 16ml. Enfin, 1780µl de MSO dissoute en PBS stérile ou de PBS stérile seul sont ajoutés avant l'incubation de 7 heures sous agitation orbitale à 90rpm à 37°C. La concentration de la MSO ajoutée dépend des conditions expérimentales.

VI - Dosage du glycogène

VI.A - Principe

Le dosage du glycogène se fait de manière enzymatique par mesure d'absorbance en suivant la réaction décrite en figure 45.

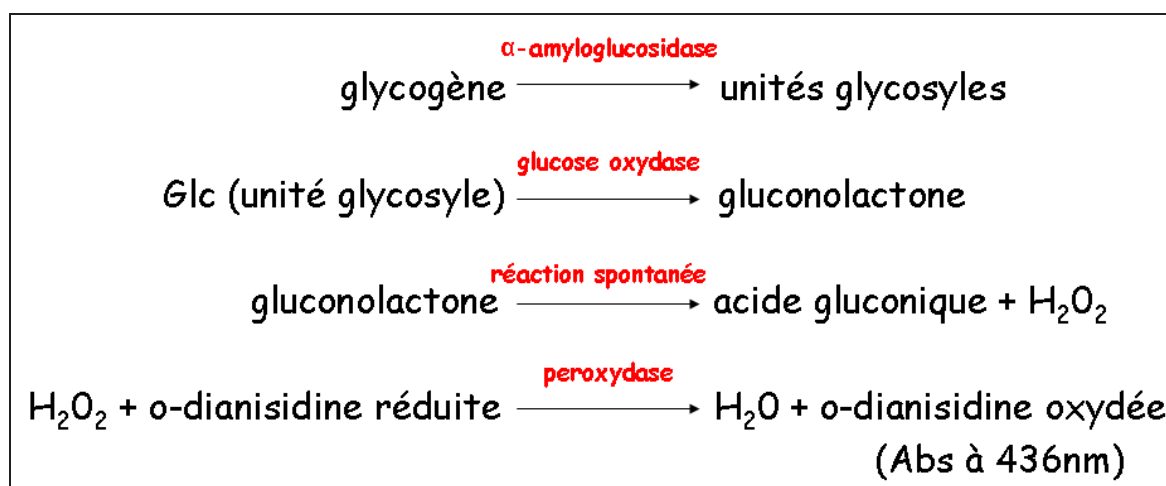


Figure 45 : Réactions enzymatiques dans le dosage du glycogène

Le schéma ci-dessus montre que l'o-dianisidine oxydée est le dernier réactif de cette cascade de réaction. La mesure de l'absorbance à 436 nm permet indirectement de mesurer la quantité de glucose libre et celle provenant de l'hydrolyse du glycogène.

VI.B - Récolte des cellules pour le dosage du glycogène

Il est nécessaire de réaliser la récolte des cellules à la température la plus basse possible car les cellules en souffrance dégradent rapidement le glycogène de manière enzymatique. Aussi, les boîtes reposent sur de la glace pendant les différents lavages afin de maintenir une température la plus faible possible.

Les boîtes sont lavées trois fois avec 5ml de PBS glacé pour éliminer le milieu. Un reste de milieu augmenterait artificiellement la concentration en glucose libre et en protéines, faussant ainsi le dosage du glycogène astrocytaire. En effet, la quantité de glycogène est pondérée par la concentration protéique des échantillons pour comparer les échantillons entre eux.

Les cellules sont récoltées par raclage de la boîte et transférées dans un microtube. L'utilisation de trypsine n'est pas adaptée ici car la température est proche de 0°C, rendant la trypsine inefficace. Les microtubes sont centrifugés (centrifugeuse Allegra 64R centrifuge, Beckman Coulter) 5 minutes à 1000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et 250µl de HClO₄ 0,2N sont ajoutés pour lyser les cellules et précipiter les protéines.

Les échantillons sont homogénéisés et soniqués à 4°C (ultrason VibraCell, Fischer Bioblock) pour finir de lyser les cellules (deux fois 30 secondes, à puissance 7, cycle 50%). Un prélèvement de 20µl est réalisé pour le dosage protéique (réalisé selon le protocole page 109). Après une centrifugation de 30 minutes à 30000 g à 4°C, le surnageant est récupéré.

VI.C - Homogénéisation du tissu cérébral

Le dosage du glycogène est réalisé sur environ 80mg de poudre issue de cortex préparée selon le protocole décrit précédemment (chapitre IV, page 102). Pour 1mg de tissus, un volume de 5µl d'HClO₄ 0,2N est ajouté. L'homogénéisation est réalisée à l'Ultra-Turrax (Ultra-Turrax T8, Ika Labortechnik) 30 secondes à puissance 3 puis 30 secondes à puissance 5 en conservant l'échantillon dans la glace. Un prélèvement de 20µl est réalisé pour le dosage protéique (réalisé selon le protocole page 109). Après une centrifugation de 30 minutes à 30000 g à 4°C, le surnageant est récupéré.

VI.D - Méthodologie du dosage

Le dosage peut être réalisé avec l'α-amyloglucosidase (mesure du glucose libre et impliqué dans les molécules de glycogène) ou sans l'α-amyloglucosidase (dosage du glucose libre uniquement). Le glucose total et le glucose libre sont tous les deux mesurés sur les échantillons cellulaires mais seul le glucose total est mesuré sur les échantillons tissulaires, la quantité tissulaire de glucose libre étant négligeable.

Pour doser le glucose total, 20µl de tampon acide acétique 2M pH 4,8 sont d'abord ajoutés à 100µl de surnageant pour augmenter le pH de l'échantillon jusqu'au pH optimal de fonctionnement de la première enzyme (pH 4,8). Vingt microlitres d'α-amyloglucosidase (dissoute à 100U/ml en eau ultrapure) sont ensuite ajoutés. L'incubation dure 1 heure à 37°C.

L' α -amyloglucosidase est remplacée par de l'eau ultrapure pour doser le glucose libre et l'incubation d'une heure est réalisée dans la glace.

Un témoin de l'activité de l' α -amyloglucosidase est réalisé à partir de glycogène commercial à une concentration de 75 μ g/ml en HClO₄ 0,2N. Le protocole de traitement de ce témoin est identique à celui des échantillons.

Pour la réalisation de la gamme étalon, du glucose est dissout à 5mg/ml en HClO₄ 0,2N puis une solution intermédiaire à 100 μ g/ml en HClO₄ 0,2N est réalisée pour obtenir la gamme de concentration ci-dessous (tableau 5).

Tableau 5 : Gamme de concentrations de glucose

C° finales en glucose, en μ g/ml	0	0	20	40	60	80	100
Solution glucose à 100 μ g/ml, en μ l	0	10	20	40	60	80	100
HClO ₄ 0,2N, en μ l	100	90	80	60	40	20	0

Aux 100 μ l de chaque tube de la gamme de glucose, sont ajoutés 20 μ l de tampon acétate 2M pH 4,5 et 20 μ l d'eau ultrapure.

Après l'incubation et la réalisation de la gamme de glucose, 1ml d'une solution enzymatique (glucose oxydase, de peroxydase et d'o-dianisidine dissouts chacun à 50mg/l en tampon phosphate 100mM pH 7,4) est ajouté à chaque échantillon, à chaque point de la gamme étalon et au témoin glycogène. Après incubation d'une heure à 37°C, la lecture est réalisée à 436nm au spectrophotomètre (Hélios- α , Thermo Fischer).

VII - Étude l'activité de la glutamine synthétase (GS)

La mesure de l'activité de la GS est réalisée en triplicata d'après la méthode décrite par Griffith et modifiée par Blin (Blin *et al.*, 2002 ; Griffith et Meister, 1978). L'activité de la GS est mesurée grâce à la transformation du glutamate et de l'hydroxylamine en L-glutamylhydroxamate. Dans cette réaction, l'hydroxylamine remplace l'ammonium utilisé dans la réaction *in vivo* (figure 32 page 80).

Le cortex est réduit en poudre suivant le protocole décrit et il est homogénéisé à l'Ultra-Turrax dans du tampon imidazole 100mM pH 7,2 avec un rapport de 5 μ l de tampon par mg de cortex. L'homogénat est centrifugé à 50000 g pendant 60 minutes à 4°C. Le surnageant est prélevé et mis à incuber 10 minutes à 37°C pour éliminer le glutamate endogène de l'échantillon.

Après cette incubation, 50 μ l de surnageant sont mis en présence de 300 μ l de tampon d'incubation (adénosine triphosphate 20mM, β -mercaptoéthanol 10mM, chlorure de magnésium 40mM, hydroxylamine 100mM, imidazole 100mM, pH 7,2) contenant du L-glutamate et la MSO dans des concentrations variables en fonction des paramètres étudiés. Le L-glutamate est à 50mM dans du tampon d'incubation pour déterminer l'activité maximale et l'inhibition par la MSO et une gamme de dilution de 1/2 en 1/2 du L-glutamate entre 0,2 et

50mM est réalisée pour étudier la cinétique GS/L-glutamate. Une gamme de dilution du $\frac{1}{4}$ en $\frac{1}{4}$ de MSO entre 1,5nM et 25mM est utilisée pour déterminer la constante d'inhibition de la GS par la MSO.

La réaction est arrêtée après 30 minutes à 37°C, suivie d'un retour à 4°C pendant 5 minutes, avec 800 μ l de solution d'arrêt (trichlorure de fer 370mM, acide chlorhydrique 670mM, acide trichloroacétique 200mM). Le mélange est centrifugé 5 minutes à 10000 g à 4°C et l'absorbance du surnageant est mesuré à 535nm. L'activité de la GS est exprimée en nmol de L-glutamylhydroxamate/min/mg de protéines. Le protocole du dosage protéique est donné page 109.

VIII - Étude des glycannes

VIII.A - Les glycoprotéines

VIII.A.1 - Extraction et marquage des échantillons protéiques à la biotine

Les glycoprotéines sont présentes dans tous les compartiments cellulaires ainsi que dans les membranes. Le protocole d'extraction doit donc permettre de récupérer le maximum de protéines, qu'elles soient membranaires ou cytosoliques. L'interaction lectine/glycoprotéine peut être mise en évidence soit par inhibition avec un traceur, soit par l'utilisation d'un anticorps secondaire ou bien par marquage direct de l'échantillon. Cette dernière option est retenue, avec l'utilisation de biotine fonctionnalisée.

Le tampon d'extraction est basé sur du PBS auquel ont été ajoutés du Triton X100 (0,05%), de l'EDTA (20mM) et un cocktail commercial d'inhibiteur de protéases (1%) pour éviter toute dégradation des extraits. Ce tampon permet ainsi l'extraction conjointe des protéines membranaires et des protéines cytosoliques. L'extraction protéique est réalisée sur environ 80mg de poudre issue de cortex préparée selon le protocole décrit précédemment (chapitre IV, page 102). Pour 1mg de tissus, un volume de 5 μ l de tampon d'extraction est ajouté. L'homogénéisation est réalisée à l'Ultra-Turrax (Ultra-Turrax T8, Ika Labortechnik) 30 secondes à puissance 3 puis 30 secondes à puissance 5 en conservant l'échantillon dans la glace. Après une incubation de 15 minutes pour déstructurer plus les membranes, toujours dans la glace, les échantillons sont centrifugés 30 minutes à 20000 g à 4°C.

Le surnageant, soit environ 400 μ l, est ensuite récupéré et 25 μ l de marqueur à 10mg/ml en eau sont ajoutés. Le marqueur (figure 46) est composé d'une partie biotine, d'un bras espaceur (long chain, LC) et d'une fonction réactive N-hydroxysuccinimide sulfaté (S-NHS). La présence d'un bras espaceur permet de rendre la biotine plus accessible pour une interaction avec l'avidine.

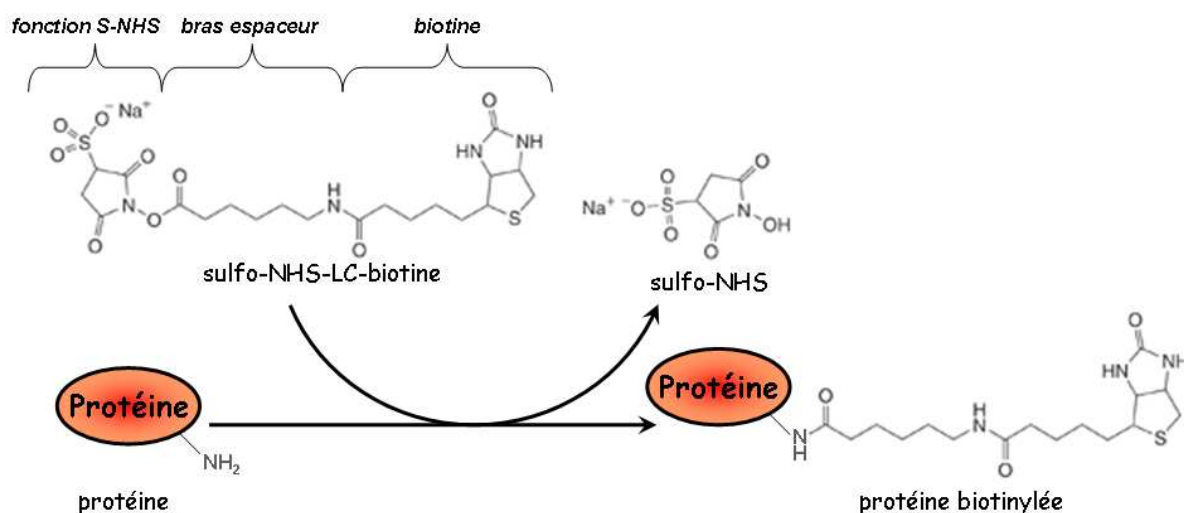


Figure 46 : Marquage des protéines par la LC-Biotine
(source : fournisseur Pierce)

Une incubation de 30 minutes est nécessaire au marquage des protéines. L'excès de biotine est ensuite éliminé par ultrafiltration. Les Vivaspins (Sartorius, réf VS0102), sont des unités de filtration tangentielle par centrifugation, composées d'une membrane en polyéthersulfone (PES), avec des pores dont le seuil de coupure est ici de 10kDa, et peuvent contenir 2ml d'échantillon. Les pores des Vivaspins sont d'abord saturés avec 1ml de PBS contenant 0,5% d'albumine de sérum bovin (BSA) puis rincés 2 fois avec 1ml de PBS. Les cycles de centrifugation pour les lavages et les rinçages sont de 1270 g à 4°C pendant 10 minutes. Le rétentat est enlevé entre chaque étape pour éliminer l'excès d'BSA. Le Vivaspin est alors prêt à être utilisé.

L'échantillon est ensuite déposé dans le Vivaspin pour être purifié par des cycles de centrifugation de 20 minutes à 1270 g à 4°C. Deux cycles sont réalisés pour éliminer la biotine. Le volume est alors complété à 2ml avec du PBS avant chaque cycle. Deux autres cycles permettent de concentrer l'échantillon. Aucun volume de PBS n'est alors rajouté avant la centrifugation. Le rétentat est enfin récupéré et la concentration protéique est mesurée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) dont le protocole est décrit en page 109.

VIII.A.2 - Glycoprofil protéique

L'étude de la glycosylation est réalisée en microplaques dans lesquelles des lectines ont été fixées au fond de chaque puits (Landemarre et Duverger, 2011). Les plaques sont fournies par GLYcoDiag en kit prêt à l'emploi. Ce kit est composé de 17 lectines permettant de couvrir un large spectre dans la reconnaissance des glycannes.

Les plaques sont décongelées à température ambiante et la solution de conservation remplissant les puits est vidée. Les échantillons protéiques sont dilués à 20µg/ml dans du PBS complet (noté PBS+, composé de PBS, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 0,5mM) puis déposés en duplicata sur chaque lectine, à raison de 50µl/puits. L'incubation est réalisée pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Les plaques sont ensuite vidées et lavées 3 fois avec 200µl/puits de PBS+.

Le composé avidine-peroxydase fourni avec le kit GLYcoDiag est dilué en PBS+ puis 50µl sont déposés dans chaque puits. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, les plaques sont de nouveau vidées et lavées 3 fois avec 200µl/puits de PBS+.

Un substrat de la peroxydase, le dichlorure d'o-phenylènediamine est utilisé pour la révélation. Pour 10ml de tampon phosphate-citrate 50mM pH 5,0, 4µl de peroxyde d'hydrogène 30% et 4mg de dichlorure d'o-phenylènediamine sont ajoutés. Cent microlitres par puits sont déposés et après une incubation de 15 minutes, la réaction est stoppée par ajout de 100µl d'acide chlorhydrique 1N.

Les absorbances, révélatrices de l'interaction de chaque lectine avec les glycoprotéines de l'échantillon, sont mesurées à 450nm (lecteur de microplaques Packard Fusion α).

VIII.B - La glycosylation de surface des astrocytes

Les cellules, en tube de 50ml, sont centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et les cellules sont lavées avec 10ml de PBS puis centrifugée 10 minutes à 1000 g. Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 10ml de PBS. Le marquage des cellules est alors réalisé avec 5µl de N-succinimidyl-carboxyfluorescéine diacétylée (CFSE) à 90mM pendant 15 minutes à 37°C sous agitation orbitale à 90rpm.

Après les 15 minutes d'incubation à 37°C, les cellules sont centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et les cellules sont lavées avec 10ml de PBS puis centrifugée 10 minutes à 1000 g. Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 2ml de PBS+. Les cellules sont alors comptées avec la méthode du bleu Trypan et du PBS+ est ajouté pour avoir une concentration cellulaire de 10^6 cellules/ml. Les cellules marquées sont déposées sur les lectines, fixées au fond des puits du kit GLYcoDiag, à raison de 50µl/puits, soit 5×10^4 cellules/puits. Une gamme étalon de cellules est réalisée par une dilution de 1/2 en 1/2 des cellules à partir de chaque échantillon déposé sur les lectines.

Les cellules sont incubées 2 heures à l'obscurité sur les lectines, puis les puits sont lavés 3 fois avec 200µl/puits de PBS+. Enfin, 100µl de PBS+ sont déposés dans les puits contenant les lectines et toutes les plaques, y compris la gamme étalon, sont lues en fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 485nm et une longueur d'onde d'émission de 520nm (lecteur de microplaques Packard Fusion α). Les intensités de fluorescence mesurées sont dépendantes de la quantité de produit de dégradation du CFSE formé.

IX - Dosage protéique selon la méthode de Bradford

Le dosage est réalisé en microplaque avec du réactif de Bradford commercial permettant de quantifier les protéines dans un échantillon. Le principe repose sur l'interaction du colorant, bleu de Coomassie G-250, avec certains acides aminés des protéines (essentiellement l'arginine et dans une moindre mesure la lysine et les résidus aromatiques) qui entraîne un décalage du maximum d'absorption de ce colorant de 465 nm vers 595 nm. L'absorbance lue à 595 nm est alors proportionnelle à la concentration de protéines. Cette

technique à l'avantage de subir moins d'interférences avec des détergents et offre une sensibilité environ 4 fois supérieure que celle de Lowry (Bradford, 1976 ; Lowry *et al.*, 1951). Le domaine de linéarité de cette méthode se situe entre 1 et 25µg/ml de protéines en microplaque.

Une gamme d'étalonnage est réalisée en triplicata à partir d'une solution standard de BSA à 100 µg/ml. Des dilutions sont effectuées en PBS dans un volume final de 200 µl afin d'obtenir la gamme de concentration suivante : 1; 2,5; 5; 10; 15; 20; et 25 µg/ml.

La quantité de protéine dans chaque échantillon est déterminée avec trois dilutions qui diffèrent en fonction du type d'échantillon. Ceux provenant d'une lyse des cellules sont en milieu fortement acide avec l'HClO₄ 0,2N. Une augmentation du pH des 20µl d'échantillon est réalisée avec 2µl de tampon acétate 2M pH 4,8 puis des dilutions au 1/40, 1/100 et 1/200 sont effectuées. Les échantillons protéiques marqués à la biotine sont quant à eux dosés avec des dilutions au 1/20, 1/50 et 1/200.

Le dosage, réalisé en triplicata pour chaque dilution, est effectué sur 200µl auxquels 50µl de réactif de Bradford sont ajoutés. Après agitation par aspirations/refoulements, les microplaques sont lues à 620nm (lecteur de microplaques Packard Fusion α).

X - Traitement des résultats

Les cinétiques enregistrées après injection de MSO, que ce soit pour la variation des quantités de glycogène ou la glycosylation, ont été analysées par le test MANOVA (analyse de la variance multivariée) grâce au logiciel Statview alors que les résultats à un temps précis ont été analysés avec un test de Student (test *t*). La comparaison est effectuée pour les valeurs (correspondant également à l'aire sous la courbe), ou pour la variation des valeurs (augmentation / diminution / stagnation).

Les constantes cinétiques de la glutamine synthétase ont été déterminées par le logiciel GraphPad pour chaque échantillon. Pour chaque lignée de souris, la moyenne de chaque constante a été calculée et elles ont été comparées entre elles par un test *t*.

Les valeurs présentées correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (SEM) pour le nombre d'animaux testés. Les valeurs sont considérées comme significativement différentes avec un pourcentage d'erreur inférieur à 5% pour $p < 0,05$, inférieur à 1% pour $p < 0,01$ ou inférieur à 0,1% pour $p < 0,001$.

Résultats et discussion

I - Variation du glycogène cérébral

Pour une meilleure lisibilité, la dose de MSO injectée ou pour laquelle a été réalisée l'injection de sérum physiologique est indiquée entre parenthèse après le nom de la lignée.

I.A - Le glycogène tissulaire

I.A.1 - Étude des différences entre les mâles et les femelles

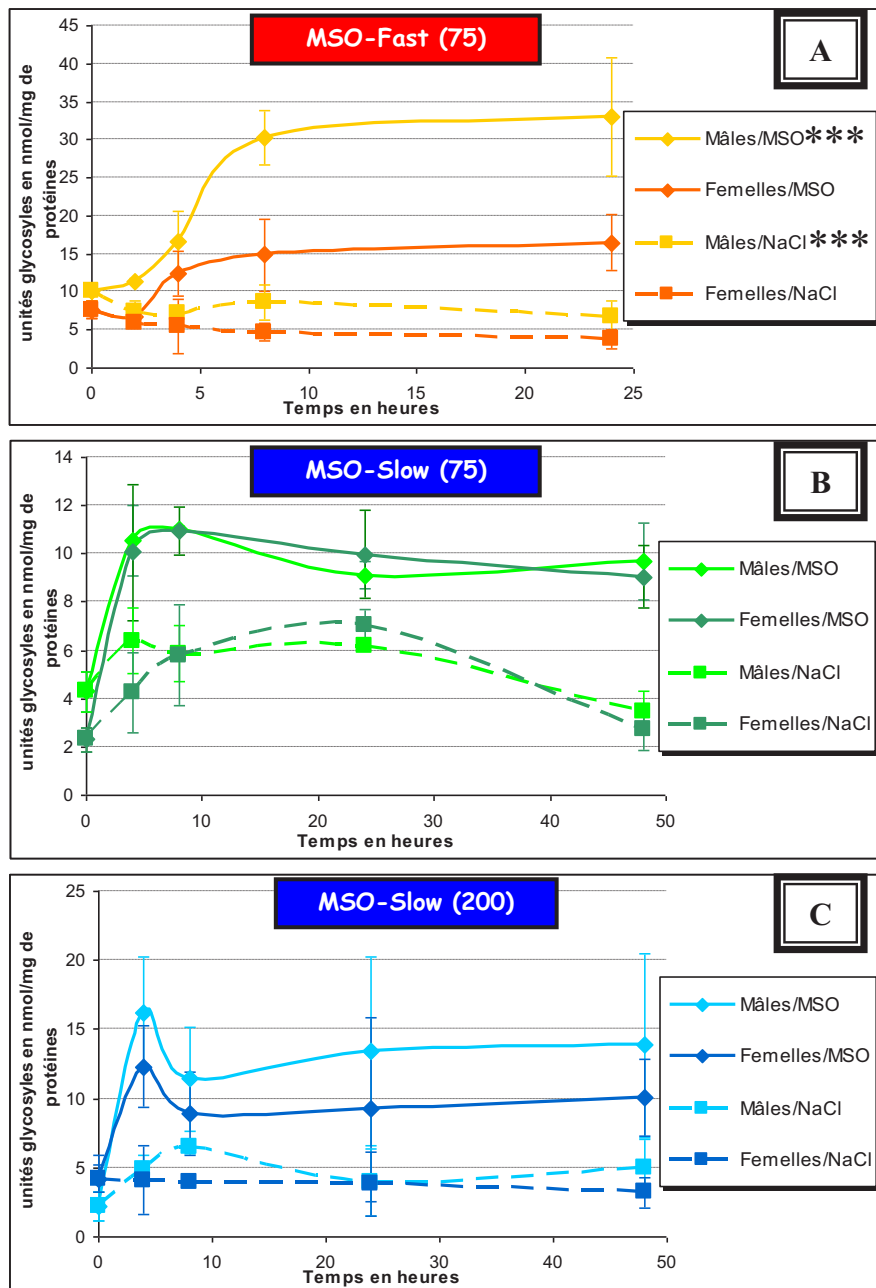


Figure 47 : Effet de la MSO sur le taux de glycogène en fonction du sexe
 A) MSO-Fast injectées par la MSO à 75mg/kg et témoin (NaCl) correspondant. B) MSO-Slow injectées par la MSO à 75mg/kg et témoin (NaCl) correspondant. C) MSO-Slow injectées par la MSO à 200mg/kg et témoin (NaCl) correspondant. Moyenne \pm SEM, n=3-4. Analyse par le test MANOVA, *** : $p < 0,001$.

La concentration corticale de glucose libre est négligeable par rapport à la concentration corticale de glucose constituant le glycogène. Quels que soient la lignée et le sexe, la MSO entraîne une augmentation de la quantité de glycogène ($p < 0,0001$). Le taux de glycogène cérébral a été étudié séparément chez les mâles et les femelles pour chaque condition (figure 47).

Seules les MSO-Fast ont un taux de glycogène différent en fonction du sexe, aussi bien avec une injection de la MSO à 75 mg/kg ($p < 0,0001$) qu'avec une injection de sérum physiologique ($p = 0,0003$). Pour ces deux différences, les taux de glycogène sont plus faibles chez les femelles que chez les mâles. La variation du taux de glycogène en fonction du temps après injection de sérum physiologique est en revanche identique entre les mâles et les femelles MSO-Fast ($p = 0,6611$).

Les femelles MSO-Fast injectées avec du sérum physiologique ont un taux de glycogène proche de celui des femelles MSO-Slow ($p = 0,3817$ pour les femelles MSO-Fast(75) vs les femelles MSO-Slow(75) et $p = 0,2306$ pour les femelles MSO-Fast(75) vs les femelles MSO-Slow(200)). La variation du taux de glycogène en fonction du temps est quant à elle différente entre les femelles MSO-Fast(75), qui ont un taux de glycogène diminuant en fonction du temps, et les femelles MSO-Slow(75), qui ont un taux augmentant jusqu'à 24 heures. Les MSO-Slow(200) ont un taux constant qui conduit à une absence de différence par rapport aux femelles des autres conditions :

-femelles MSO-Slow (75) vs femelles MSO-Slow (200) : $p = 0,0624$

-femelles MSO-Fast (75) vs femelles MSO-Slow (200) : $p = 0,4423$

-femelles MSO-Slow (75) vs femelles MSO-Fast (75) : $p = 0,0031$

Les mâles MSO-Fast sont quant à eux différents des mâles MSO-Slow, après injection de sérum physiologique, aussi bien pour le taux de glycogène ($p = 0,0010$ pour les mâles MSO-Fast(75) vs les mâles MSO-Slow(75) et $p < 0,0001$ pour les mâles MSO-Fast(75) vs les mâles MSO-Slow(200)), que pour la variation du taux de glycogène ($p = 0,0259$ pour les mâles MSO-Fast(75) vs les mâles MSO-Slow(75) et $p = 0,0067$ pour les mâles MSO-Fast(75) vs les mâles MSO-Slow(200)).

La quantité de glycogène après injection de sérum physiologique étant plus élevée chez les MSO-Fast que chez les MSO-Slow, l'effet de la MSO doit être étudié par rapport au témoin pour chaque lignée et chaque dose. Une distinction doit être également faite entre les mâles et les femelles pour chaque condition expérimentale.

I.A.2 - Comparaison des souris des lignées consanguines à celles des lignées en cours de sélection

Le taux de glycogène a été mesuré sur des souris des lignées en cours de sélection, soit après 6 croisements avec sélection par l'injection de MSO (génération G6). Les résultats obtenus sur les souris consanguines sont comparés aux résultats obtenus avec les souris G6 (figures 48 et 49).

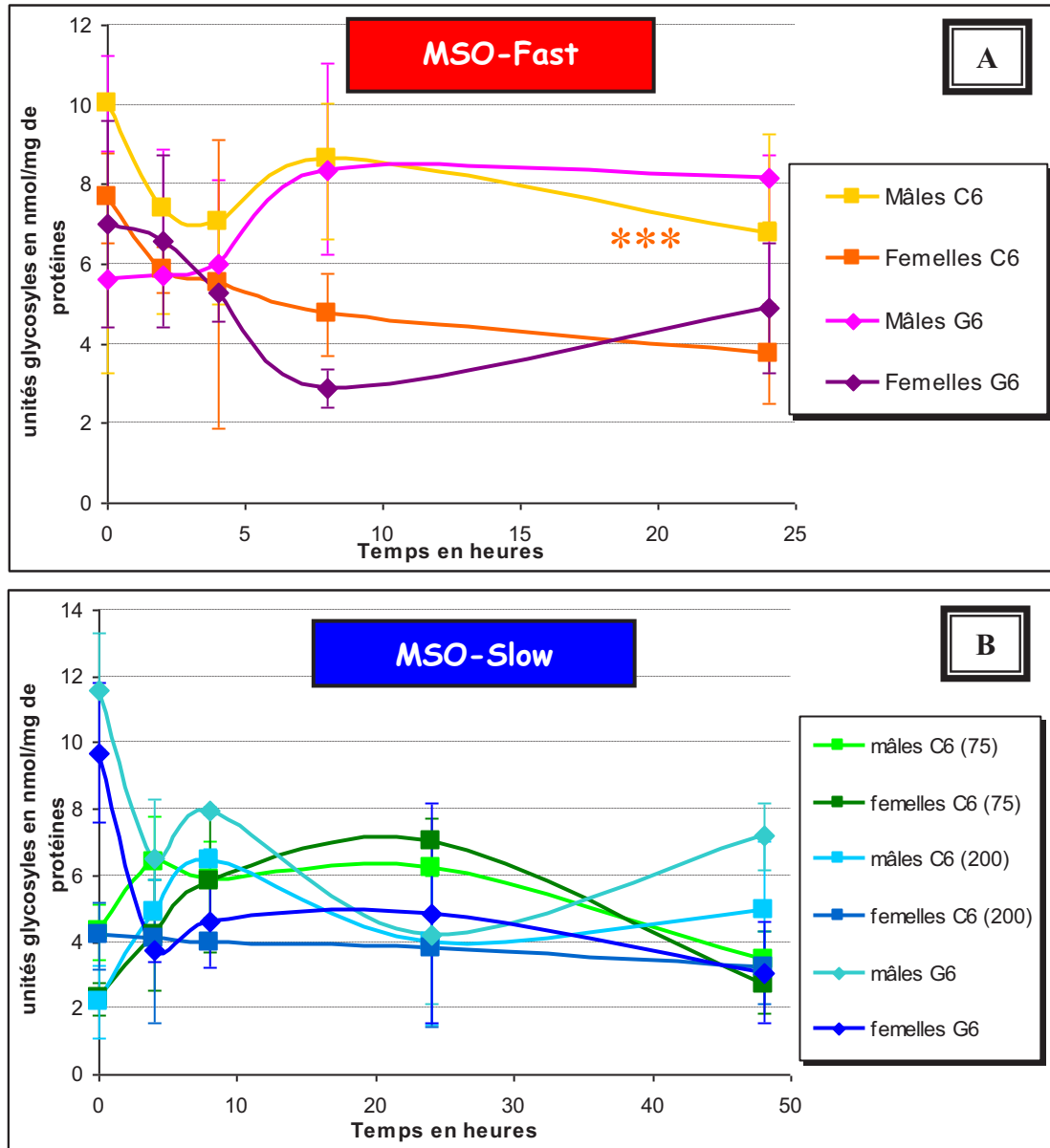


Figure 48 : Taux de glycogène chez les souris C6 et G6 après injection de sérum physiologique A) MSO-Fast B) MSO-Slow. Moyenne \pm SEM, n=3-5. Les nombres entre parenthèses indiquent la dose de MSO pour laquelle a été réalisé le contrôle. La couleur des astérisques indique la courbe à laquelle se rapporte la significativité pour la variation. Analyse par le test MANOVA, *** : $p < 0,001$.

Les quantités de glycogène en fonction du temps sont identiques entre les mâles MSO-Fast consanguines et les MSO-Fast de génération 6 après injection avec du sérum physiologique, aussi bien pour les mâles ($p=0,0805$) que pour les femelles ($p=0,5930$). La quantité de glycogène après injection de sérum physiologique est également identique entre les souris MSO-Slow consanguines et les MSO-Slow de la génération 6, excepté à T0 ($p < 0,0001$).

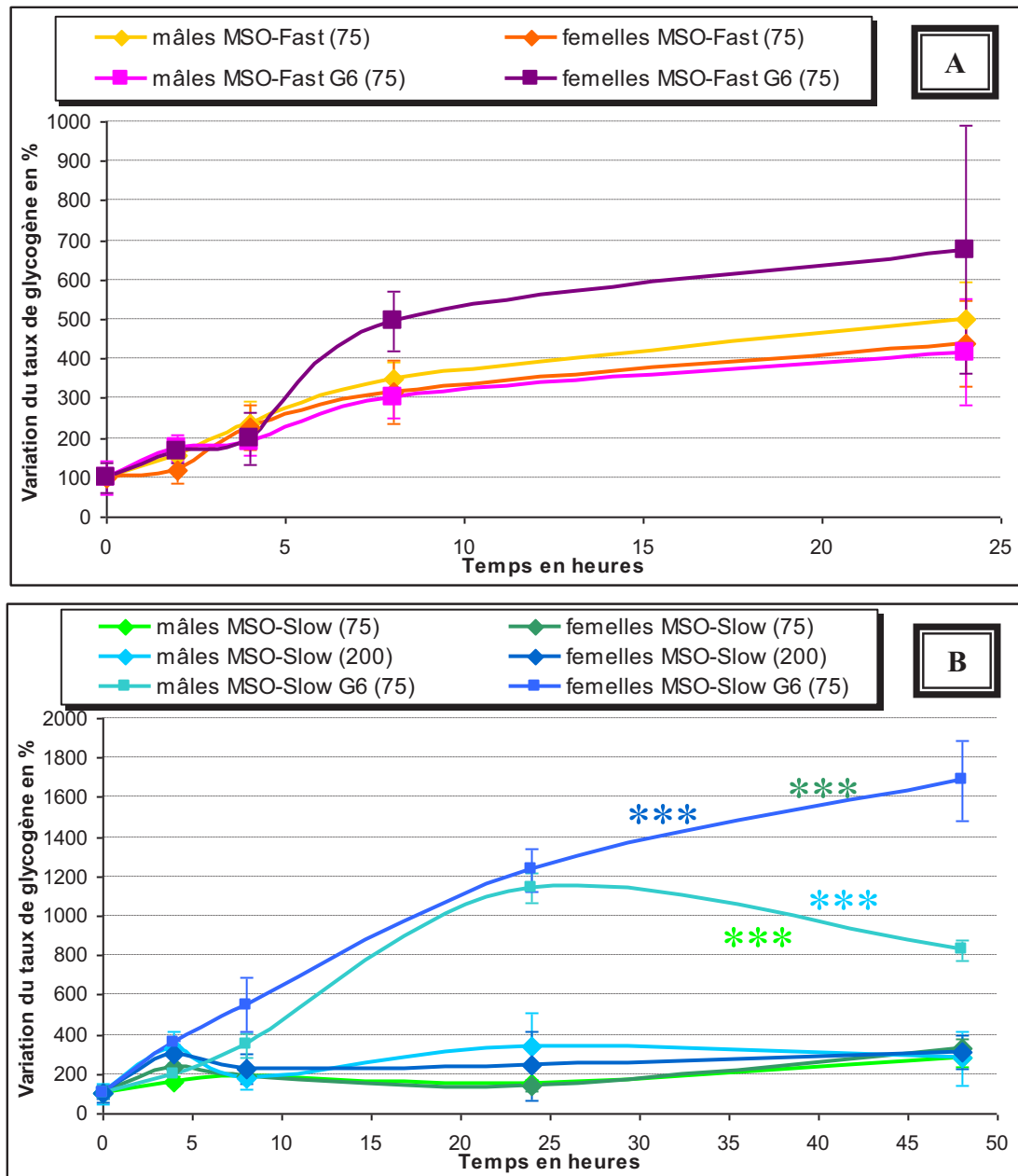


Figure 49 : Variation du taux de glycogène chez les souris C6 et G6 après injection de MSO
 A) MSO-Fast. B) MSO-Slow. Moyenne \pm SEM, n=3-5. Les résultats sont exprimés en % du taux mesuré après injection de sérum physiologique pour chaque condition. Les nombres entre parenthèses indiquent la dose de MSO injectée. La couleur des astérisques indique la courbe à laquelle se rapporte la significativité pour la variation. Analyse par le test MANOVA, ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

Les femelles MSO-Fast G6 ne sont pas différentes des femelles MSO-Fast consanguines pour le taux de glycogène après injection de MSO ($p=0,2564$), tout comme les mâles MSO-Fast consanguins ne sont pas différents des mâles MSO-Fast G6 ($p=0,0550$). L'injection d'une dose de MSO de 75mg/kg ou 200 mg/kg n'entraîne qu'une faible augmentation du taux de glycogène par rapport aux MSO-Fast, au maximum 350% du contrôle, chez les souris consanguines en comparaison de l'évolution du taux de glycogène chez les souris de la génération 6 dans les mêmes conditions et qui peut atteindre 1700% ($p < 0,0001$), comme le montre la figure 49B. Les étapes supplémentaires de sélection par la MSO et les étapes de consanguinité ont donc conduit à une modification de la variation du taux de glycogène uniquement chez les MSO-Slow.

I.A.3 - Comparaison des lignées consanguines entre elles

Il n'y a pas de différence dans la variation du taux de glycogène en fonction du sexe quelles que soient la lignée et la dose injectée (figure 50).

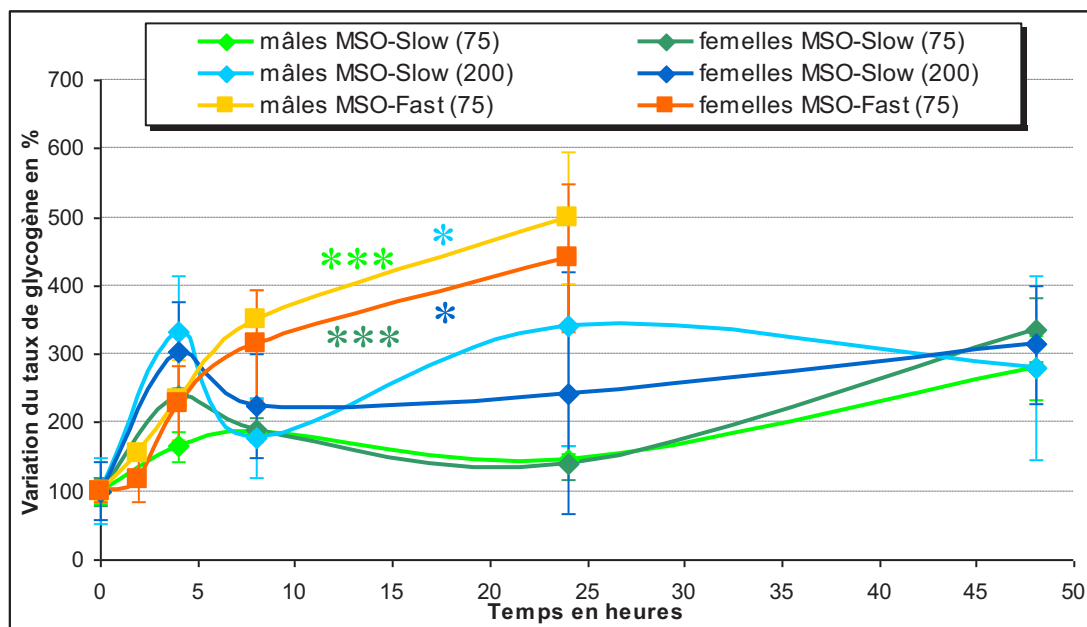


Figure 50 : Variation du taux de glycogène pour les souris MSO-Fast et MSO-Slow.

Moyenne \pm SEM pour $n=3-4$. Les résultats sont exprimés en % du taux mesuré après injection de sérum physiologique pour chaque condition. Les nombres entre parenthèses indiquent la dose de MSO injectée. La couleur des astérisques indique la courbe à laquelle se rapporte la significativité pour la variation. Analyse par le test MANOVA, * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$

Les MSO-Slow injectées avec de la MSO à 75mg/kg accumulent environ 3 fois plus de glucose sous forme de glycogène jusqu'à 48 heures après l'injection, avec cependant une diminution à 24 heures (145%). Bien que la variation du taux de glycogène accumulé soit identique chez les MSO-Slow entre les doses de 75 et 200mg/kg de MSO ($p=0,0703$ entre les mâles et $p=0,4492$ entre les femelles), l'accumulation de glycogène est maximale à 4 heures après l'injection d'une dose de 200mg/kg de MSO. Ce taux diminue ensuite fortement à 200% du témoin 8 heures après l'injection et reste enfin constant à 300% de 24 à 48 heures après l'injection de MSO.

La variation du taux de glycogène est identique chez les MSO-Fast (figure 50) entre les mâles et les femelles ($p=0,8980$). L'accumulation de glycogène se poursuit jusqu'à 24 heures après l'injection de MSO. Cette accumulation correspond à un taux de glycogène 4 à 5 fois supérieur au taux de glycogène des souris témoins. Les MSO-Fast, aussi bien les mâles que les femelles, ont une augmentation du taux de glycogène supérieure aux variations pour les MSO-Slow injectées à 75 et 200mg/kg :

-MSO-Slow (75) vs MSO-Fast (75) : $p < 0,0001$, aussi bien entre les mâles qu'entre les femelles

-MSO-Slow (200) vs MSO-Fast (75) : $p=0,0111$ entre les mâles et $p=0,0361$ entre les femelles

Les courbes varient le plus à 4, 8 et 24 heures après l'injection de MSO. Les valeurs à ces trois temps sont donc isolées des valeurs à 0, 2 et 48 heures (figure 51).

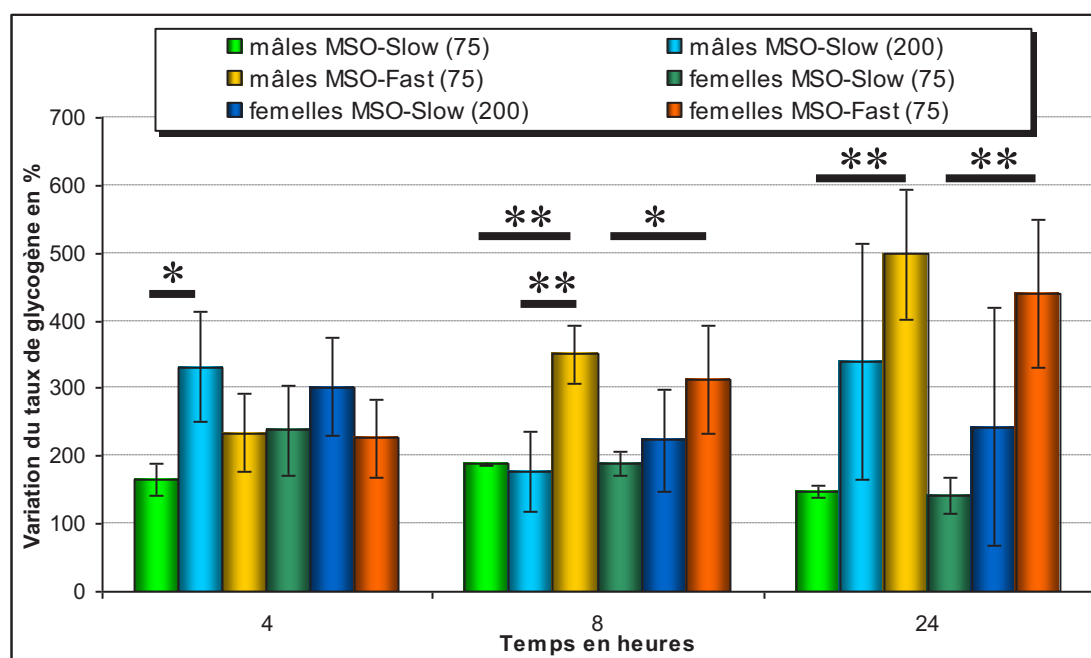


Figure 51 : Variation du taux de glycogène à 4, 8 et 24 heures après injection de MSO pour les MSO-Fast et les MSO-Slow. Moyenne \pm SEM pour $n=3-8$. Les nombres entre parenthèses indiquent la dose de MSO injectée. Analyse par le test t , * : $p<0,05$; * : $p<0,01$; *** : $p<0,001$.

Une dose de 200mg/kg induit un taux de glycogène plus fort chez les mâles MSO-Slow à 4 heures qu'une dose de 75mg/kg ($p=0,0267$) alors qu'il n'y a pas de significativité pour les femelles ($p=0,3221$). Avec une dose identique de 75 mg/kg de MSO, la variation de glycogène entre les MSO-Slow et les MSO-Fast est différente dès 8 heures après l'injection de MSO, quel que soit le sexe. Seuls les mâles MSO-Fast sont différents des mâles MSO-Slow injectés à 200mg/kg à 8 heures ($p=0,0030$ pour les mâles et $p=0,1964$ pour les femelles).

I.B - Le glycogène astrocytaire *in vitro*

L'étude de l'effet de la MSO sur des astrocytes cultivés *in vitro* permet de s'affranchir du phénomène de dégradation du glycogène provoqué par les neurones pour leurs besoins énergétiques. *In vitro*, les variations du taux de glycogène astrocytaire enregistrées présentent l'avantage d'être indépendantes des convulsions observées chez l'animal après injection de MSO. L'effet-doses de la MSO sur les astrocytes des souris MSO-Slow et MSO-Fast consanguines est présenté figure 52.

De très faibles concentrations de MSO, à partir de 100pM, suffisent pour provoquer une biosynthèse de glycogène chez les astrocytes de souris MSO-Slow alors qu'il faut une quantité de MSO un million de fois supérieure, soit 100 μ M, pour induire la glycogenèse chez les astrocytes de souris MSO-Fast. La quantité de glycogène accumulée est elle aussi très différente. Alors que la MSO à 10mM conduit à une accumulation de glycogène chez les astrocytes de souris MSO-Slow 4 fois supérieure au taux en condition basale, l'augmentation de la quantité de glycogène induite par cette même dose de MSO pour les astrocytes de souris MSO-Fast n'est que de 50% par rapport aux conditions basales.

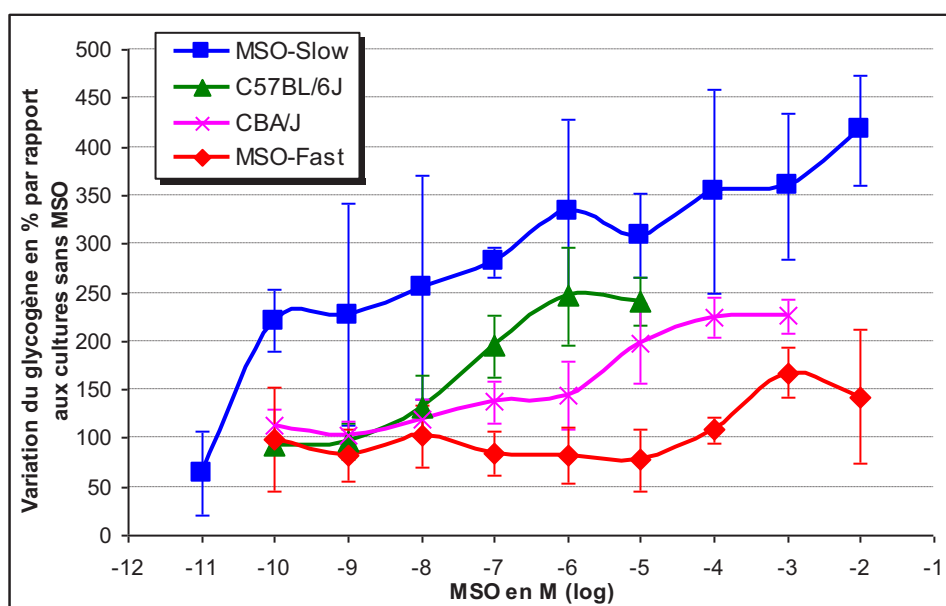


Figure 52 : Effet de la MSO sur le glycogène astrocytaire
Incubation 7 heures avec la MSO. Moyenne \pm SEM pour n=2-4. Les valeurs pour les C57BL/6J et les CBA/J correspondent aux résultats déjà publiés (Bernard-Hélary *et al.*, 2002).

En comparant les résultats obtenus à ceux publiés sur les lignées C57BL/6J et CBA/J (Bernard-Hélary *et al.*, 2002), les souris MSO-Slow et MSO-Fast ont des variations extrêmes par rapport à ces deux lignées. La MSO induit une réponse plus forte sur la variation de la quantité de glycogène chez les MSO-Slow que chez les C57BL/6J et une réponse plus faible chez les MSO-Fast que chez les CBA/J (Boissonnet *et al.*, 2011).

1.C - Effet de la MSO sur la quantité de glycogène

L'effet glycogénique de la MSO a été décrit aussi bien après injection à des souris qu'*in vitro* sur des cultures astrocytaires (Bernard-Hélary *et al.*, 2002 ; Bernard-Hélary *et al.*, 2000 ; Folbergrová *et al.*, 1969 ; Hevor *et al.*, 1986 ; Swanson *et al.*, 1989). Bien que les femelles MSO-Fast aient un taux de glycogène plus faible que les mâles MSO-Fast, la variation induite par la MSO est identique entre les deux sexes, aussi bien pour les MSO-Fast que pour les MSO-Slow.

L'accumulation du glycogène chez les souris MSO-Fast est plus importante au niveau tissulaire qu'au niveau cellulaire, avec des maxima respectifs de 500% et 170% alors que la concentration de MSO injectée aux souris est plus faible que celle déposée sur astrocytes. En effet, les astrocytes *in vivo* ne reçoivent qu'une partie du 1,5mg de MSO injecté en moyenne à une souris, les astrocytes *in vitro* sont directement en contact des 16mg ajoutés dans la boîte alors qu'une boîte de culture contient moins d'astrocytes qu'un cerveau de souris. Il est donc probable que la plus forte accumulation de glycogène astrocytaire enregistrée chez les souris MSO-Fast après injection de MSO par rapport à l'accumulation mesurée sur les astrocytes en culture soit due à la présence des neurones au niveau du cerveau.

La MSO induit une accumulation du glycogène *in vitro* dans les astrocytes de souris MSO-Slow même à de très faible dose de MSO alors que l'injection d'une dose de 200mg/kg à des souris de cette lignée n'entraîne qu'une faible accumulation de glycogène par rapport

aux souris MSO-Fast. La dose de 200mg/kg induit une accumulation de glycogène plus rapide que la dose de 75mg/kg, avec une accumulation maximale dès 4 heures après l'injection de MSO. Les MSO-Slow ont donc la capacité d'accumuler du glycogène aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

L'accumulation du glycogène induite par la MSO est plus forte pour les astrocytes MSO-Slow que pour les astrocytes MSO-Fast. Cette différence est inversée *in vivo* avec une accumulation de glycogène mesurée plus forte chez les MSO-Fast. La plus grande complexité au niveau tissulaire, avec notamment les interactions entre les astrocytes et les neurones, pourrait expliquer ces différentes réponses à la MSO. La plus faible accumulation du glycogène *in vivo* chez les MSO-Slow peut être due soit à une biosynthèse plus faible, provoquée par une diminution de l'activité de la glycogène synthase ou de la concentration en glucose, soit à une augmentation du catabolisme du glycogène par la glycogène phosphorylase.

II - L'activité de la glutamine synthétase (GS)

II.A - Étude de l'activité de la GS avec du glutamate

L'utilisation d'une gamme de concentration de glutamate permet d'étudier l'activité de la GS en fonction des lignées de souris (figure 53).

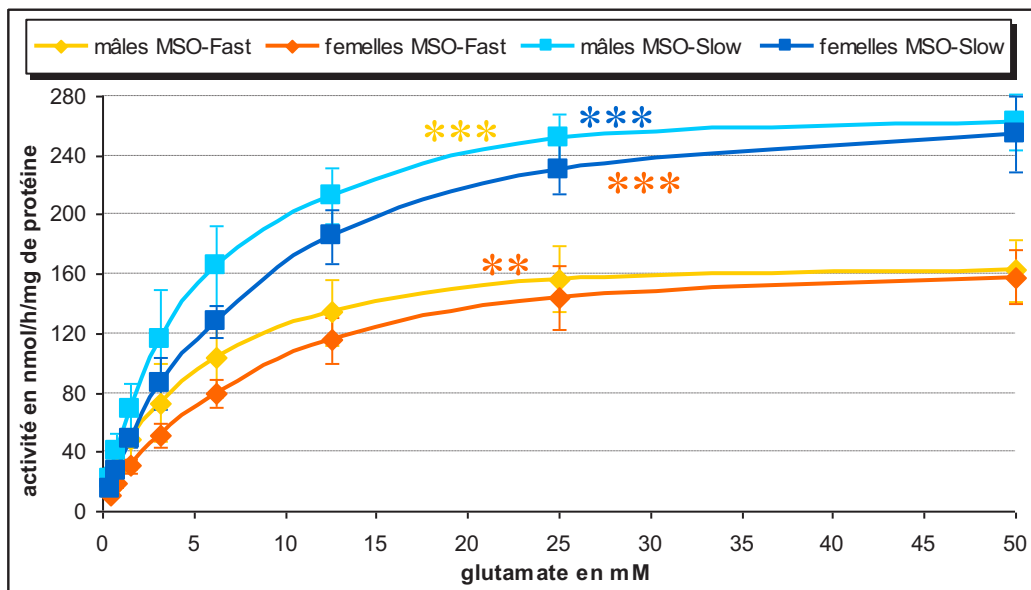


Figure 53 : Activité de la glutamine synthétase corticale chez les MSO-Slow et les MSO-Fast. La couleur des astérisques indique la courbe à laquelle se rapporte la significativité entre les valeurs. Moyenne \pm SEM pour n=5. Analyse par le test MANOVA, ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

Quelle que soit la lignée, il existe des différences entre les mâles et les femelles pour les valeurs ($p < 0,0001$ pour les MSO-Slow et $p = 0,0085$ pour les MSO-Fast), alors que les variations sont identiques ($p = 0,7634$ pour les MSO-Slow et $p = 0,9695$ pour les MSO-Fast). L'activité maximale est en revanche identique entre les mâles et les femelles d'une même lignée.

L'activité de la GS est différente entre les MSO-Slow et les MSO-Fast. Plus de glutamate peut être modifié par la GS des MSO-Slow ($p < 0,0001$, entre les mâles et entre les femelles) mais également avec une vitesse différente ($p = 0,0003$ entre les mâles et $p < 0,0001$ entre les femelles). Ainsi la quantité de GS présente dans un mg de protéines cérébrales peut transformer en une heure jusqu'à 260nmol de glutamate pour la GS des MSO-Slow contre 160nmol de glutamate pour les souris MSO-Fast.

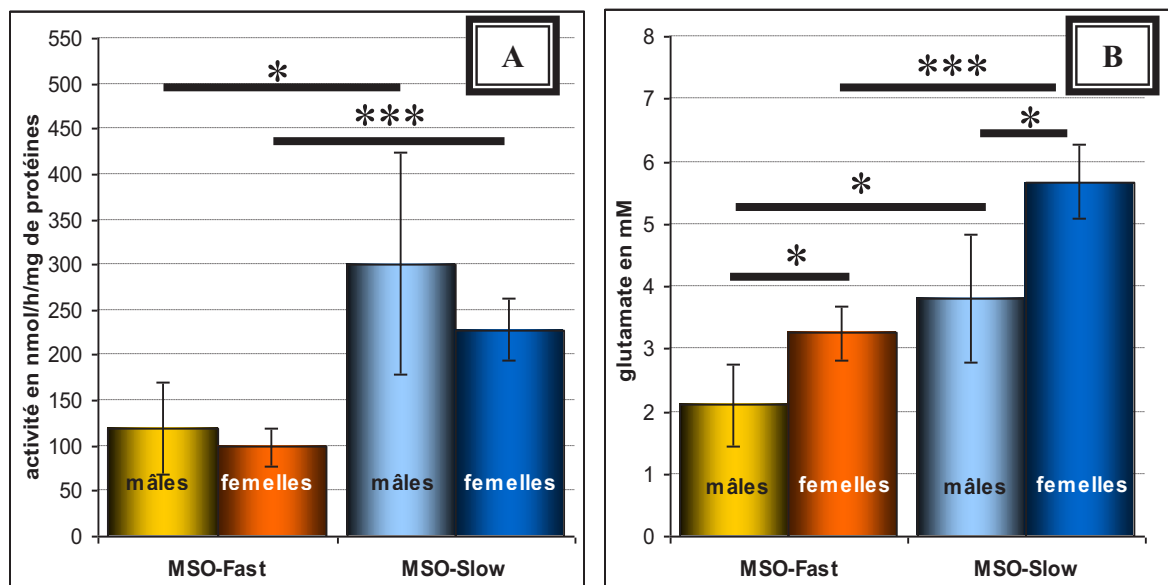


Figure 54 : Constantes cinétiques pour la glutamine synthétase avec le glutamate
 A) Vitesse initiale maximale (V_{max}) pour le glutamate. B) Constante de Michaelis (K_m) du glutamate.
 Moyenne \pm SEM pour $n=5$. Analyse par le test t , * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$

La détermination des constantes cinétiques confirment les différences entre d'une part les mâles et les femelles à l'intérieur de chaque lignée et d'autre part entre les MSO-Fast et les MSO-Slow. La vitesse initiale maximale (V_{max} , figure 54A) est plus faible pour les MSO-Fast que pour les MSO-Slow ($p = 0,0323$ entre les mâles et $p = 0,0008$ entre les femelles). Il n'y a pas de différence mâles/femelles concernant la V_{max} des GS ($p = 0,3090$ pour les MSO-Slow et $p = 0,5440$ pour les MSO-Fast).

La constante de Michaelis (K_m , figure 54B) révèle l'affinité de la GS pour le glutamate. Les mâles ont un K_m plus faible que les femelles ($p = 0,0316$ pour les MSO-Slow et $p = 0,0289$ pour les MSO-Fast). Le K_m de la GS pour le glutamate reste de l'ordre du mM quels que soient le sexe et la lignée d'origine mais les MSO-Fast possèdent néanmoins une GS plus affine pour le glutamate que les MSO-Slow ($p = 0,0495$ entre les mâles et $p = 0,0004$ entre les femelles).

II.B - Étude de l'inhibition de la GS par la MSO

L'inhibition de la GS est déterminée en réalisant une gamme de dilution de MSO (figure 55).

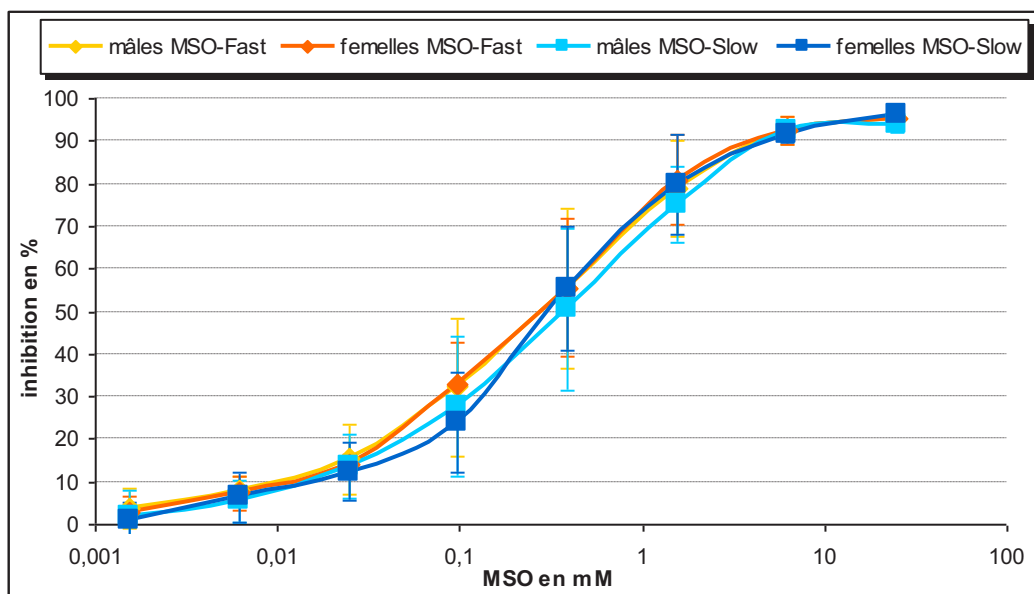


Figure 55 : Inhibition de la glutamine synthétase corticale par la MSO en présence de 50mM de glutamate chez les MSO-Slow et les MSO-Fast. Moyenne \pm SEM pour n=5. Analyse par le test MANOVA.

Il n'existe aucune différence entre les courbes pour l'inhibition de la GS par la MSO en présence de 50mM de glutamate. Les K_i calculés ne sont donc pas différents les uns des autres après analyse par un test *t*. Ils sont compris entre 0,41mM pour les femelles MSO-Slow et 0,62mM pour les mâles MSO-Slow.

La plus faible quantité de GS active chez les MSO-Fast pourrait être compensée partiellement par une activité plus importante, conduisant à une absence de crises épileptiques spontanées. Il se peut cependant que cette plus faible quantité soit un des facteurs conduisant à l'apparition de crises chez les MSO-Fast après injection de MSO, contrairement aux MSO-Slow.

III - Étude de la glycosylation

III.A - Les glycoprotéines

III.A.1 - Profil général et méthode de traitement des résultats

Les profils de glycosylation sont réalisés sur un ensemble de lectines permettant d'étudier les principales structures des N- et O-glycannes (figure 56). Les lectines sont identifiées en fonction de leurs spécificités de reconnaissance (tableau 6).

Tableau 6 : Nom des lectines utilisées et structures reconnues
En italique, les lectines utilisées uniquement pour l'étude de la glycosylation de surface

Identifiant des lectines	Structure reconnue
CF-1	core Fuc (GlcNAc(Fuc)GlcNAcGln)
M-1	Man (tous les N-glycannes)
GAN-1	GalNAc (reconnaissance des N- et O-glycannes)
GAN-2	α GalNAc (spécifique des O-glycannes)
GAN-3	β GalNAc terminal
<i>GAN-4</i>	GalNAc et plus particulièrement ceux des glycolipides
GA-1	β Gal
GA-2, GA-4	Gal
GA-3	lactose (Gal β 1-4Glc), lactosamine (Gal β 1-4GlcNAc)
GUN-1	GlcNAc terminal
GUN-2, <i>GUN-3</i>	enchaînement de GlcNAc
<i>GUN-4</i>	GlcNAc, de préférence dans des enchaînements de GlcNAc
F-1, F-2	Fuc
SA-1	acide sialique lié en α 2-3
SA-2	acide sialique lié en α 2-6
CX-1	complexe, N-glycannes tri-, tetra- et penta-antennés
CX-2	complexe, antennes des N-glycannes (Man(Man)Man)

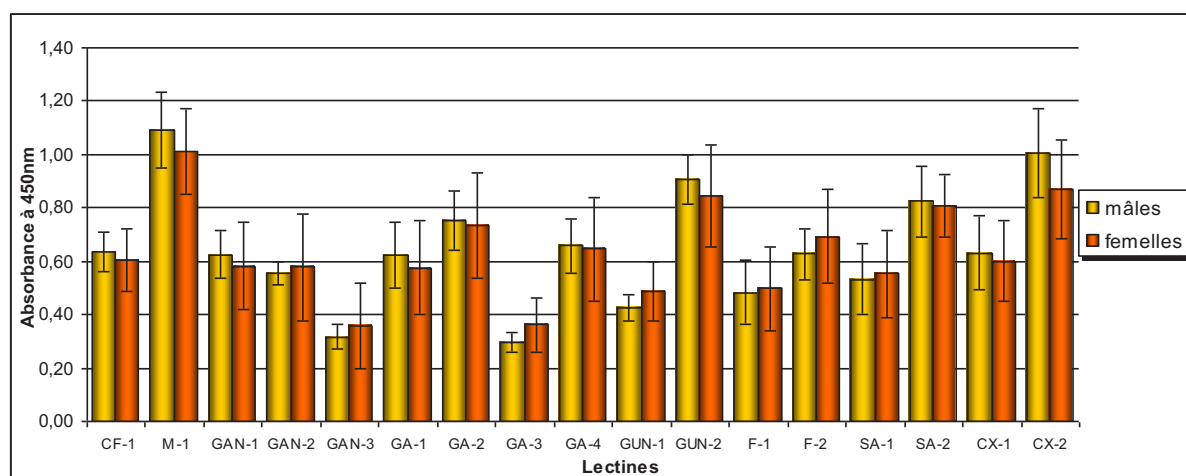


Figure 56 : Profils de glycosylation des protéines du cortex cérébral des souris MSO-Fast sacrifiées immédiatement après injection de sérum physiologique. Moyenne \pm SEM, n=4

Ces deux profils comportent certaines caractéristiques propres à des échantillons contenant des O-glycannes et des N-glycannes, ces derniers étant en plus forte proportion que les O-glycannes. En effet, les lectines pour lesquelles l'interaction est la plus forte sont celles reconnaissant les Man (M-1), les enchaînements de GlcNAc (GUN-2) et les structures complexes (CX-2). Les lectines CF-1 et CX-1 possèdent des signaux d'intensité intermédiaire, indiquant que les structures correspondantes, respectivement la core fucosylation et les structures poly-antennées, ne sont présentes que pour certains N-glycannes. Le niveau intermédiaire d'interaction des lectines spécifiques du Gal (GA-1 à GA-4), couplé à une interaction assez forte des lectines SA-1 et surtout SA-2 montre que la plupart des N-glycannes se terminent par un acide sialique le plus souvent lié en α 2-6. Certaines structures O-glycanniques semblent peu présentes, comme le β GalNAc (GAN-3) et la

lactosamine (GA-3). Les profils sont similaires entre les MSO-Slow et les MSO-Fast, avant et après injection de MSO. Afin d'analyser au mieux et de trouver les différences d'interaction ou les lectines variant simultanément, les interactions des différentes lectines ont été ajustés sur une des lectines pour chaque échantillon, constituant ainsi le 100% d'intensité (figure 57).

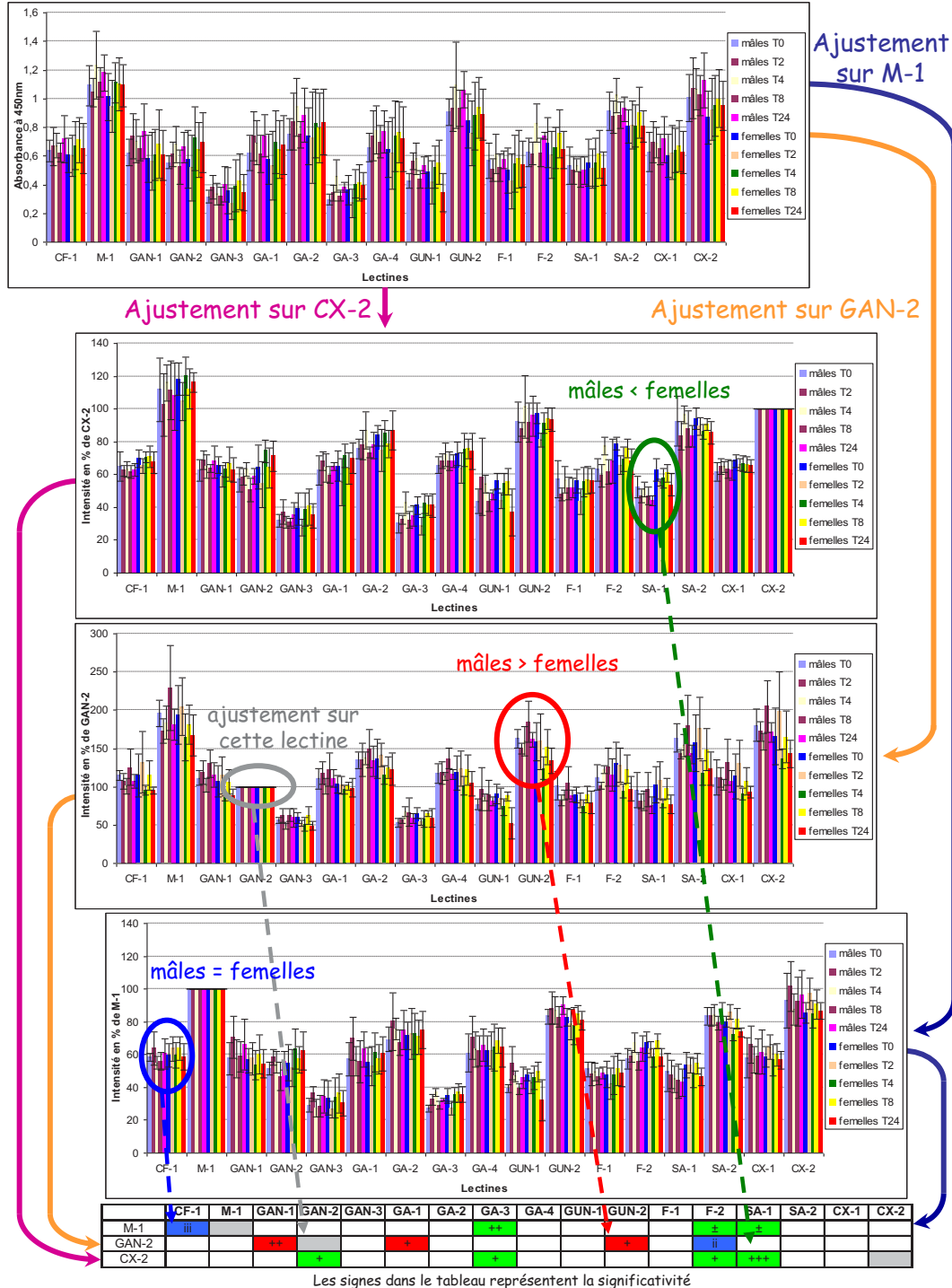


Figure 57 : Schéma du traitement des résultats pour les glycoprotéines

exemple du schéma : MSO-Fast à différents temps après injection avec du sérum physiologique, mâles vs femelles

CF-1 : lectine reconnaissant le core fucose
 M-1 : lectine reconnaissant des structures avec du Man
 GAN-1, GAN-2, GAN-3 : lectines reconnaissant des structures avec du GalNAc
 GA-1, GA-2, GA-3, GA-4 : lectines reconnaissant des structures avec du Gal
 GUN-1, GUN-2 : lectines reconnaissant des structures avec du GlcNAc
 F-1, F-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Fuc
 SA-1, SA-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Neu5Ac
 CX-1, CX-2 : lectines reconnaissant des structures complexes

La lectine sur laquelle est réalisé l'ajustement peut varier en fonction des conditions (sexe ou traitement des souris). Pour diminuer le risque de rencontrer ce problème, trois ajustements différents ont été réalisés sur trois lectines, M-1, GAN-2 et CX-2. Ces lectines reconnaissent des structures différentes : tous les N-glycannes pour M-1, une partie des N-glycannes pour CX-2 et enfin la plupart des O-glycannes pour GAN-2. Le principe de l'ajustement est donné en figure 57.

III.A.2 - Comparaisons des profils de glycosylation après injection de sérum physiologique

Une différence ayant été trouvée dans la variation de glycogène et l'activité de la GS pour les mâles et les femelles d'une même lignée, les caractéristiques des profils de glycosylation sont tout d'abord comparées entre elles (comparaison mâles/femelles). Les profils de glycosylation sont analysés entre eux en tenant compte de l'effet du temps après l'injection de MSO ou de sérum physiologique. Ces analyses, réalisées par le test MANOVA, sont présentées dans les tableaux 7 et 8, avec en colonne les différentes lectines et en ligne les lectines sur lesquelles l'ajustement est réalisé. Deux codes permettent de synthétiser les données obtenues entre le groupe 1 et le groupe 2, ces groupes étant déterminés dans la légende de chaque tableau :

-code couleur : **bleu** pour l'identité, **vert** pour l'augmentation du groupe 2 par rapport au groupe 1, **rouge** pour la diminution du groupe 2 par rapport au groupe 1, **gris** pour les lectines sur lesquelles se fait l'ajustement (différence entre les groupes impossible) et **blanc** pour l'absence de significativité.

-signes : **i** pour $p > 0,9$; **ii** pour $p > 0,95$; **iii** pour $p > 0,99$; **iiii** pour $p > 0,999$; \pm pour $p < 0,1$; + pour $p < 0,05$; ++ pour $p < 0,01$; +++ pour $p < 0,001$.

Afin de clarifier l'analyse des résultats, des termes sont simplifiés :

- " femelles (MSO-Slow/MSO-Fast) " remplace les " glycoprotéines extraites du cortex cérébral des souris femelles (MSO-Slow/MSO-Fast) "
- " mâles (MSO-Slow/MSO-Fast) " remplace les " glycoprotéines extraites du cortex cérébral des souris mâles (MSO-Slow/MSO-Fast) "
- " MSO-Slow " remplace les " glycoprotéines extraites du cortex cérébral des souris MSO-Slow "
- " MSO-Fast " remplace les " glycoprotéines extraites du cortex cérébral des souris MSO-Fast "

Tableau 7 : MSO-Fast après injection de sérum physiologique mâles (groupe 1) vs femelles (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1	iii							++					±	±			
GAN-2			++			+					+		ii				
CX-2				+				+					+	+++			

- Les proportions entre GA-3, F-2 et SA-1 d'une part et la proportion entre M-1 et CX-2 d'autre part sont gardées entre les mâles et les femelles MSO-Fast (intensité supérieure de GA-3, F-2 et SA-1 chez les femelles après ajustement sur M-1 et CX-2 (tableau 7)).

CF-1 : lectine reconnaissant le core fucose	SA-1, SA-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Neu5Ac
M-1 : lectine reconnaissant des structures avec du Man	CX-1, CX-2 : lectines reconnaissant des structures complexes
GAN-1, GAN-2, GAN-3 : lectines reconnaissant des structures avec du GalNAc	
GA-1, GA-2, GA-3, GA-4 : lectines reconnaissant des structures avec du Gal	
GUN-1, GUN-2 : lectines reconnaissant des structures avec du GlcNAc	
F-1, F-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Fuc	

- GAN-1 et GAN-2 ne semblent donc pas interagir de la même manière entre les mâles et les femelles MSO-Fast (Intensité plus faible de GAN-1 pour les femelles après ajustement sur GAN-2 (tableau 7)).

- La proportion entre CF-1 et M-1 (et par conséquent CX-2) est identique chez les mâles et les femelles MSO-Fast (Identité sur CF-1 après ajustement sur M-1 (tableau 7)).

Tableau 8 : MSO-Slow après injection de sérum physiologique mâles (groupe 1) vs femelles (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1	+++											+					
GAN-2	+						ii			±		±					
CX-2	+						i			±					±	±	

- L'interaction sur CF-1 est plus forte pour les femelles MSO-Slow (tableau 8).

- Les rapports d'intensité mâles/femelles sur CF-1, GA-2 et GUN-1 sont identiques entre l'ajustement sur GAN-2 et celui sur CX-2 (tableau 8).

Tableau 9 : Mâles après injection de sérum physiologique MSO-Fast (groupe 1) vs MSO-Slow (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1			++	±	±			++	+	++	±	±			+	i	ii
GAN-2	++	±						±						i			
CX-2			+	±	+			++	++	++				+	+	ii	

- Les mâles MSO-Fast ont des interactions plus fortes sur M-1 et CX-2 que les mâles MSO-Slow (tableau 9).

Tableau 10 : Femelles après injection de sérum physiologique MSO-Fast (groupe 1) vs MSO-Slow (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1	++		+++			±	±	±	±		++	++		+	+++	+	+
GAN-2		±	++									+				i	
CX-2		+	++	ii	i					i		±			i		

- CF-1 interagit plus avec les femelles MSO-Slow qu'avec les femelles MSO-Fast (tableau 10).

- GAN-1 interagit plus avec les femelles MSO-Slow que les femelles MSO-Fast (forte significativité dans la différence d'intensité sur GAN-1 quelle que soit la lectine sur laquelle est réalisé l'ajustement (tableau 10)).

La synthèse des résultats obtenus par les quatre comparaisons nous permet de schématiser les intensités d'interaction de lectines (figure 58).

CF-1 : lectine reconnaissant le core fucose	SA-1, SA-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Neu5Ac
M-1 : lectine reconnaissant des structures avec du Man	CX-1, CX-2 : lectines reconnaissant des structures complexes
GAN-1, GAN-2, GAN-3 : lectines reconnaissant des structures avec du GalNAc	
GA-1, GA-2, GA-3, GA-4 : lectines reconnaissant des structures avec du Gal	
GUN-1, GUN-2 : lectines reconnaissant des structures avec du GlcNAc	
F-1, F-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Fuc	

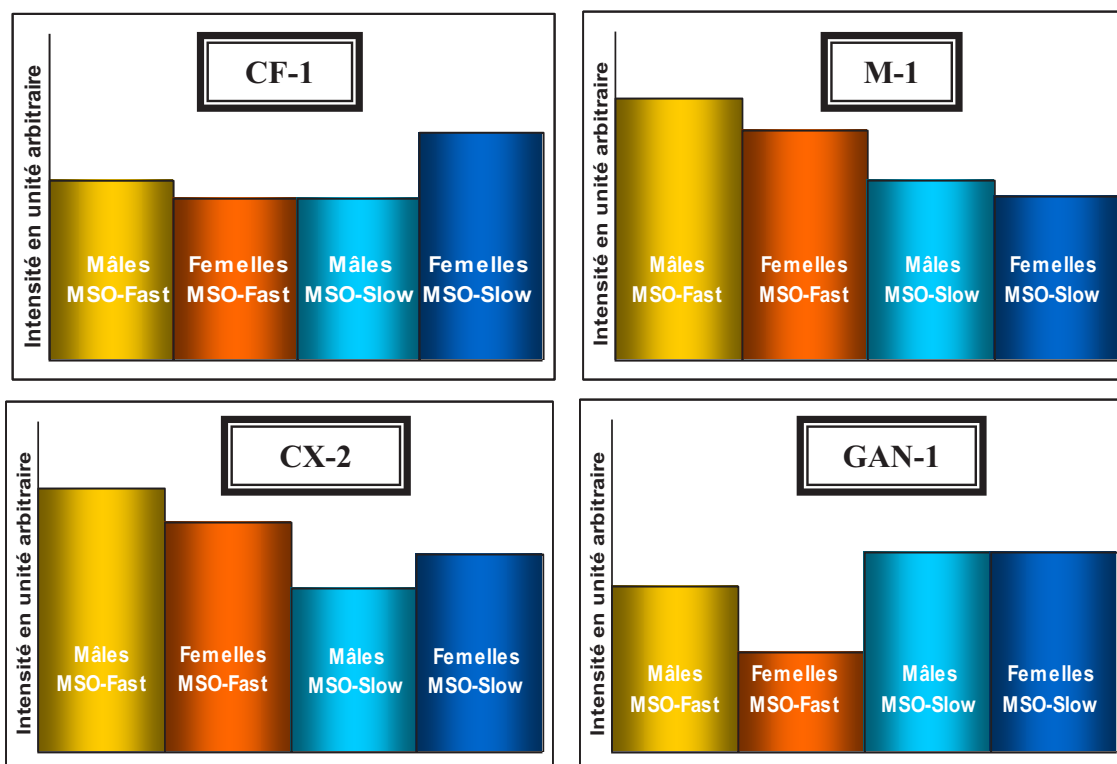


Figure 58 : Schéma représentant la proportionnalité entre les intensités sur certaines lectines des MSO-Fast et MSO-Slow

Les MSO-Fast interagissent plus avec M-1 et CX-2 alors que les MSO-Slow interagissent plus avec GAN-1. Il existe à l'intérieur de chaque lignée des différences mâles/femelles, comme sur CF-1 pour les MSO-Slow ou sur GAN-1 pour les MSO-Fast.

III.A.3 - Effet de la MSO sur la glycosylation des protéines

III.A.3.a - Effet de la MSO par rapport au sérum physiologique

Les différences entre les mâles et les femelles MSO-Fast après injection de MSO à 75 mg/kg sont peu nombreuses (tableau 11) mais elles restent cependant très proches des différences observées après injection de sérum physiologique (tableau 7).

Tableau 11 : MSO-Fast après injection de MSO à 75mg/kg mâles (groupe 1) vs femelles (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1		■					ii		i						±		
GAN-2			±	■						i						i	
CX-2	+												±	+++			■

- Certaines différences d'intensité entre les mâles et les femelles étaient déjà observées après ajustement sur CX-2 pour l'injection de sérum physiologique (tableaux 7 et 11) :

- 1) Les intensités sur F-2 et SA-1 après ajustement sur CX-2 sont plus fortes pour les femelles
- 2) L'intensité est plus faible sur GAN-1 après ajustement sur GAN-2 pour les femelles.

CF-1 : lectine reconnaissant le core fucose
 M-1 : lectine reconnaissant des structures avec du Man
 GAN-1, GAN-2, GAN-3 : lectines reconnaissant des structures avec du GalNAc
 GA-1, GA-2, GA-3, GA-4 : lectines reconnaissant des structures avec du Gal
 GUN-1, GUN-2 : lectines reconnaissant des structures avec du GlcNAc
 F-1, F-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Fuc
 SA-1, SA-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Neu5Ac
 CX-1, CX-2 : lectines reconnaissant des structures complexes

- L'intensité est différente sur CF-1 après ajustement sur CX-2 entre les mâles et les femelles (tableau 11).

En revanche, M-1 et CX-2 semblent avoir une évolution identique à GAN-2, expliquant qu'aucune différence ne soit trouvée après ajustement sur l'une des trois lectines.

Tableau 12 : Effet d'une dose convulsivante de MSO ; Femelles MSO-Fast injectées avec de la MSO à 75 mg/kg (groupe 1) ou du sérum physiologique (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1				i										iii			i
GAN-2		ii	i			ii	ii							ii			i
CX-2			i														

- Aucune différence n'est relevée pour les femelles MSO-Fast entre les injections de MSO et de sérum physiologique (tableau 12). Il se peut que l'échantillonnage soit trop faible pour que des différences deviennent significatives.

- Identités entre M-1, GAN-2 et CX-2 après ajustement sur M-1 et GAN-2 (tableau 12) : Les interactions sur ces trois lectines évoluent dans les mêmes proportions après injection de MSO.

Tableau 13 : Effet d'une dose convulsivante de MSO ; Mâles MSO-Fast injectés avec de la MSO à 75 mg/kg (groupe 1) ou du sérum physiologique (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1			i					±		±		i		iii	i	ii	ii
GAN-2	+	±			ii					ii	±						
CX-2																	

- La diminution simultanée de CF-1 et M-1 après ajustement sur GAN-2 indique que les interactions sur ces deux lectines sont modifiées dans les mêmes proportions chez les mâles MSO-Fast après injection de MSO.

L'injection d'une dose de 75mg/kg de MSO à des souris MSO-Slow ne modifie pas le profil de glycosylation (tableaux 14 et 15), contrairement à la dose de 200mg/kg (tableaux 16 et 17).

Tableau 14 : Effet d'une dose non convulsivante de MSO ; Femelles MSO-Slow injectées avec de la MSO à 75 mg/kg (groupe 1) ou du sérum physiologique (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1			iii	ii													
GAN-2										i							
CX-2												i					

Tableau 15 : Effet d'une dose non convulsivante de MSO ; Mâles MSO-Slow injectés avec de la MSO à 75 mg/kg (groupe 1) ou du sérum physiologique (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1						iii		i									
GAN-2																	
CX-2							ii							iii			

CF-1 : lectine reconnaissant le core fucose
 M-1 : lectine reconnaissant des structures avec du Man
 GAN-1, GAN-2, GAN-3 : lectines reconnaissant des structures avec du GalNAc
 GA-1, GA-2, GA-3, GA-4 : lectines reconnaissant des structures avec du Gal
 GUN-1, GUN-2 : lectines reconnaissant des structures avec du GlcNAc
 F-1, F-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Fuc
 SA-1, SA-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Neu5Ac
 CX-1, CX-2 : lectines reconnaissant des structures complexes

Tableau 16 : Effet d'une dose convulsivante de MSO ; Femelles MSO-Slow injectées avec de la MSO à 200 mg/kg (groupe 1) ou du sérum physiologique (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1						ii	ii			i							i
GAN-2		i								i							
CX-2			i								±						

Tableau 17 : Effet d'une dose convulsivante de MSO ; Mâles MSO-Slow injectés avec de la MSO à 200 mg/kg (groupe 1) ou du sérum physiologique (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1			ii											±			
GAN-2	±					i						i	i				
CX-2										ii		ii	ii				

Les éventuelles variations induites par la MSO sont trop faibles pour être significatives à 75mg/kg chez les MSO-Slow. Les intensités sur trois lectines, CF-1, GUN-2 et SA-1, sont modifiées après injection de MSO à 200mg/kg. La comparaison entre les mâles et les femelles donne plus d'informations (tableaux 18 et 19).

Tableau 18 : MSO-Slow après injection de MSO à 75mg/kg mâles (groupe 1) vs femelles (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1	++											±					
GAN-2							i										
CX-2	+									±							

Tableau 19 : MSO-Slow après injection de MSO à 200mg/kg mâles (groupe 1) vs femelles (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1	++			±			±	+			±	+		+		+	
GAN-2		±								+					±		i
CX-2		+								+					±		

- Certaines différences enregistrées entre les mâles et les femelles après injection de sérum physiologique sont conservées après injection de MSO (tableaux 8, 18 et 19). Ainsi, la différence de signal sur GUN-1 après ajustement sur CX-2 est toujours présente.

- La différence sur CF-1 entre les mâles et les femelles est elle aussi conservée (tableaux 8, 18 et 19). Elle est cependant légèrement diminuée après injection d'une dose de 75mg/kg (plus de différence après ajustement sur GAN-2). Cette différence est également plus fortement diminuée après une dose de 200mg/kg (plus de différence après ajustement sur GAN-2 et CX-2).

- La dose de 200mg/kg de MSO induit une modification de l'interaction sur M-1 chez les mâles (Intensité différente sur M-1 après ajustement sur GAN-2 et CX-2 (tableau 19)).

III.A.3.b - Comparaison des lignées entre elles

L'injection d'une dose de MSO convulsivante entraîne des différences de glycosylation entre les MSO-Slow et les MSO-Fast qui sont plus accentuées chez les femelles que chez les mâles (tableaux 20 et 21).

CF-1 : lectine reconnaissant le core fucose	SA-1, SA-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Neu5Ac
M-1 : lectine reconnaissant des structures avec du Man	CX-1, CX-2 : lectines reconnaissant des structures complexes
GAN-1, GAN-2, GAN-3 : lectines reconnaissant des structures avec du GalNAc	
GA-1, GA-2, GA-3, GA-4 : lectines reconnaissant des structures avec du Gal	
GUN-1, GUN-2 : lectines reconnaissant des structures avec du GlcNAc	
F-1, F-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Fuc	

Tableau 20 : Femelles après injection de MSO à une dose convulsivante
MSO-Fast injectées à 75mg/kg (groupe 1) vs MSO-Slow injectées à 200mg/kg (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1	+		+++			±	±		+	±	+	++		+	+++	±	++
GAN-2		+	±						iii	±							
CX-2		+	+++								ii						

- Les différences entre les femelles MSO-Slow et MSO-Fast injectées à une dose convulsivante de MSO sont similaires aux différences identifiées entre les femelles MSO-Slow et MSO-Fast injectées avec du sérum physiologique (tableaux 10 et 20).

- La modification de l'interaction induite par la MSO est plus forte sur CF-1 pour les femelles MSO-Slow. L'intensité sur CF-1 des femelles MSO-Slow est alors plus proche de celle des femelles MSO-Fast (tableau 10 et 20).

Tableau 21 : Mâles après injection de MSO à une dose convulsivante
MSO-Fast injectées à 75mg/kg (groupe 1) vs MSO-Slow injectées à 200mg/kg (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1			++		i										i		
GAN-2	j	ii	+														
CX-2			++						++					±			

- Les mâles MSO-Slow et MSO-Fast ont des interactions assez proches, si bien que très peu de différences significatives sont mises en évidence (peu de différences d'intensité après ajustement sur M-1 et CX-2 (tableau 21)). Les variations significatives étant différentes de celles obtenues avec la comparaison des mâles injectés avec du sérum physiologique (tableau 9), la MSO induirait donc une modification de l'interaction sur M-1 et CX-2 dans des proportions différentes entre les mâles MSO-Slow et les mâles MSO-Fast.

Tableau 22 : Femelles après injection de MSO à 75mg/kg
MSO-Fast (groupe 1) vs MSO-Slow (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1						i					i		±				+
GAN-2	ii		±		+		+		+								
CX-2					ii						+		+++	+	+	++	

Tableau 23 : Mâles après injection de MSO à 75mg/kg
MSO-Fast (groupe 1) vs MSO-Slow (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1	++		+++				i							i			i
GAN-2							±		i				+	+			i
CX-2	++		++		i								±				

Tableau 24 : Femelles MSO-Slow après injection de MSO
75mg/kg (groupe 1) vs 200mg/kg (groupe 2)

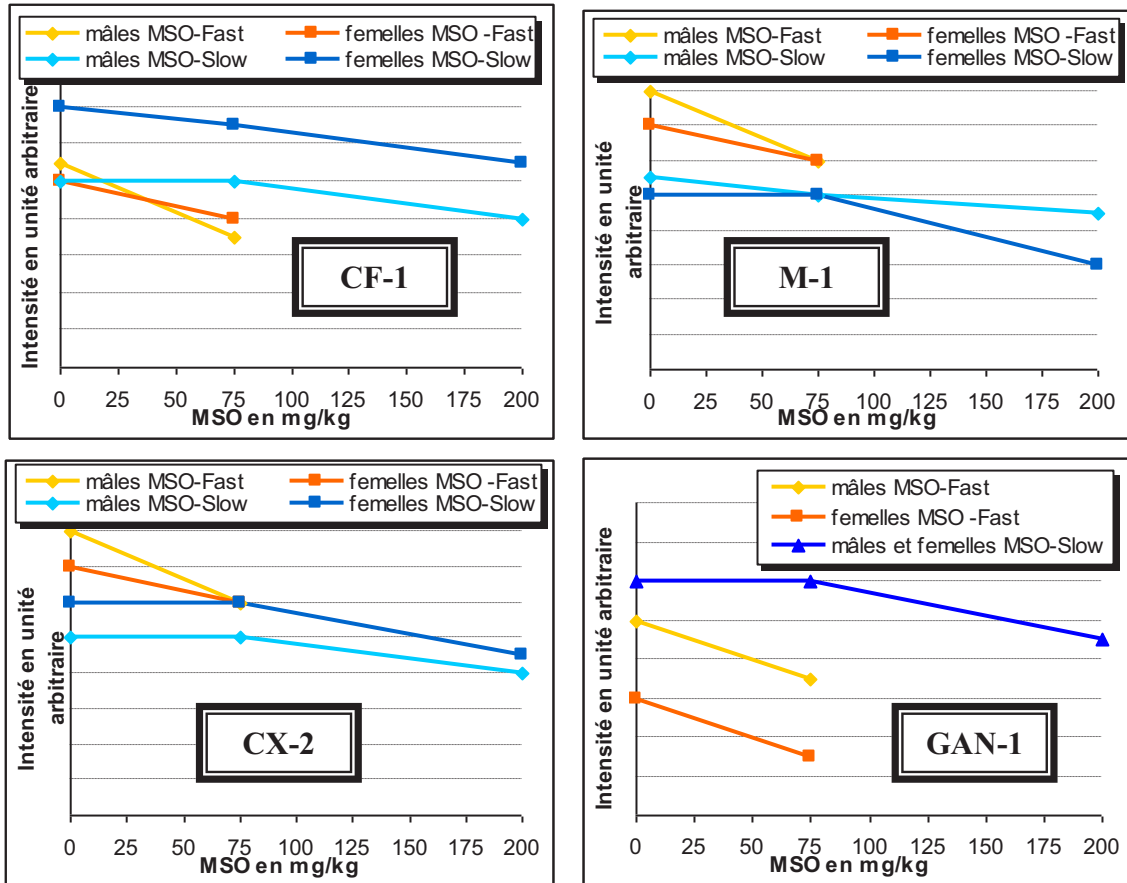
	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1	+++		+++	++		++	+		±	ii	++	+++	++	++	+	+	+
GAN-2		++			±	i				±							
CX-2		+	+						i	±		±		+			

Tableau 25 : Mâles MSO-Slow après injection de MSO
75mg/kg (groupe 1) vs 200mg/kg (groupe 2)

	CF-1	M-1	GAN-1	GAN-2	GAN-3	GA-1	GA-2	GA-3	GA-4	GUN-1	GUN-2	F-1	F-2	SA-1	SA-2	CX-1	CX-2
M-1			+					±		±		+					
GAN-2	+	++					+		iii			i					+
CX-2			++	+			i			+		+	±	+	±		

CF-1 : lectine reconnaissant le core fucose
M-1 : lectine reconnaissant des structures avec du Man
GAN-1, GAN-2, GAN-3 : lectines reconnaissant des structures avec du GalNAc
GA-1, GA-2, GA-3, GA-4 : lectines reconnaissant des structures avec du Gal
GUN-1, GUN-2 : lectines reconnaissant des structures avec du GlcNAc
F-1, F-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Fuc
SA-1, SA-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Neu5Ac
CX-1, CX-2 : lectines reconnaissant des structures complexes

La comparaison des profils obtenus chez les MSO-Slow avec la MSO à 75mg/kg par rapport à ceux obtenus avec des doses convulsivantes de MSO chez les MSO-Slow et les MSO-Fast confirme que l'injection d'une dose non convulsivante chez les MSO-Slow n'induit pas de modification du profil (tableaux 22 à 25). Les interactions sur CF-1, M-1, CX-2 et GAN-1 peuvent ainsi être schématisés avec les éventuels changements induits par l'injection de MSO sur ces quatre lectines (figure 59).



Outre les différences mâles/femelles au sein de chaque lignée et la différence de glycosylation entre les deux lignées, l'injection de MSO à une dose convulsivante induit des changements supplémentaires dans la glycosylation protéique (figure 60).

CF-1 : lectine reconnaissant le core fucose	SA-1, SA-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Neu5Ac
M-1 : lectine reconnaissant des structures avec du Man	CX-1, CX-2 : lectines reconnaissant des structures complexes
GAN-1, GAN-2, GAN-3 : lectines reconnaissant des structures avec du GalNAc	
GA-1, GA-2, GA-3, GA-4 : lectines reconnaissant des structures avec du Gal	
GUN-1, GUN-2 : lectines reconnaissant des structures avec du GlcNAc	
F-1, F-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Fuc	

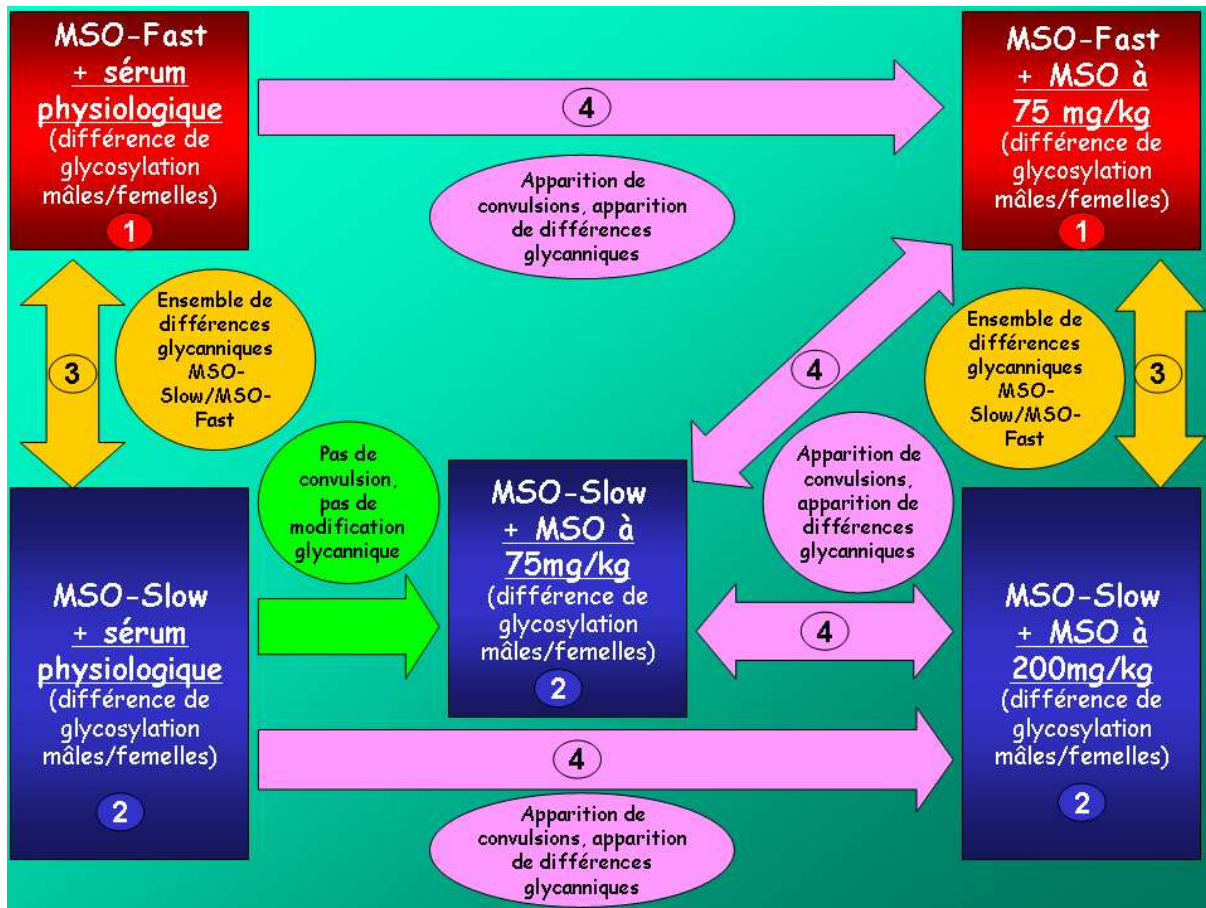


Figure 60 : Schéma des différences dans les glycoprofiles

Les ensembles de modifications similaires sont représentés par des couleurs et des numéros identiques

Il existe ainsi quatre ensembles de différences :

- Différence **mâles/femelles MSO-Fast (1)** : Interactions plus fortes des mâles sur M-1, GAN-1 et CX-2. Ainsi, il semble que les mâles MSO-Fast possèdent plus de structures mannosylées, de structures bi-antennées et de GalNac que les femelles MSO-Fast. Il est également possible que ces structures soient aussi nombreuses pour les deux sexes mais qu'elles soient plus accessibles chez les mâles.

- Différence **mâles/femelles MSO-Slow (2)** : Interactions plus fortes sur CF-1 et plus faible sur GUN-1 pour les femelles. Les N-glycannes des femelles ont plus de core fucose que les N-glycannes des mâles MSO-Slow. Les GlcNac terminales sont soit plus nombreuses soit plus accessibles chez les mâles MSO-Slow que chez les femelles.

- Différence **MSO-Slow/MSO-Fast (3)** : Interactions plus fortes sur M-1 et CX-2 pour les MSO-Fast, interaction plus forte sur GAN-1 pour les MSO-Slow. Les souris MSO-Fast possèdent plus de N-glycannes ou bien ceux-ci sont moins complexes que les souris MSO-Slow. La GalNac est en revanche moins exprimée ou accessible chez les MSO-Fast que chez les MSO-Slow.

CF-1 : lectine reconnaissant le core fucose	SA-1, SA-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Neu5Ac
M-1 : lectine reconnaissant des structures avec du Man	CX-1, CX-2 : lectines reconnaissant des structures complexes
GAN-1, GAN-2, GAN-3 : lectines reconnaissant des structures avec du GalNac	
GA-1, GA-2, GA-3, GA-4 : lectines reconnaissant des structures avec du Gal	
GUN-1, GUN-2 : lectines reconnaissant des structures avec du GlcNac	
F-1, F-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Fuc	

- Différence induite par une **dose convulsivante de MSO (4)** : Baisse de l'interaction sur CF-1, M-1, GAN-1 et CX-2. La MSO, injectée à une dose convulsivante, conduit à une baisse du nombre ou de l'accessibilité de la structure de base des N-glycannes, aussi bien chez les souris MSO-Slow que chez les MSO-Fast.

III.B - La glycosylation de surface

Les variations de glycogène étant astrocytaires, des glycoprofiles résultant de l'interaction des astrocytes en culture cellulaire issus des souris MSO-Slow et MSO-Fast ont été réalisés sur un ensemble de 16 lectines (figure 61).

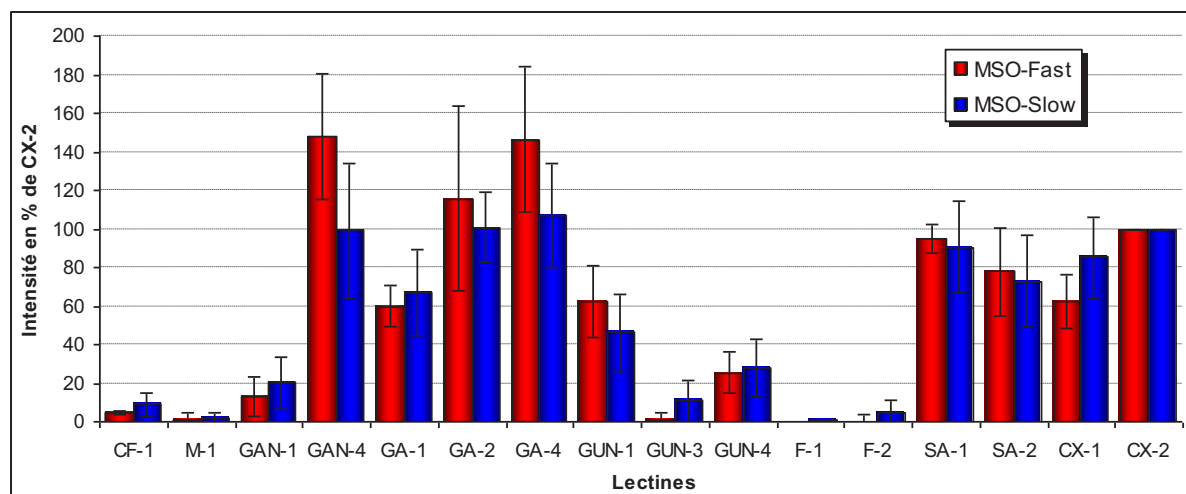


Figure 61 : Glycoprofile d'astrocytes MSO-Slow et MSO-Fast
Ajustement sur CX-2. Moyenne \pm SEM. n=2-5

Les glycoprofiles obtenus pour les astrocytes issus de souris MSO-Slow et MSO-Fast ne sont pas significativement différents. Les signaux résultent principalement de l'interaction des lectines avec des glycolipides et l'extrémité des glycoprotéines exprimés à la surface des cellules. Les lectines GAN-4 et SA-1 sont connues pour interagir avec des glycolipides. Elles reconnaissent notamment des gangliosides sialylés. Les lectines GA-2 et GA-4 reconnaissent aussi bien des glycolipides que des glycoprotéines, ce qui explique que les signaux soient également très forts sur ces deux lectines.

Les autres lectines ayant un signal intermédiaire reconnaissent toutes des extrémités de N-glycannes. Ceux-ci existent aussi bien sous forme bi-antennée (CX-2) que sous forme tri- ou tetra-antennée (CX-1). Les signaux obtenus pour les lectines SA-2, GA-1 et GUN-1 nous indiquent que se sont essentiellement des N-glycannes complexes. En effet, les lectines CF-1 et M-1 n'interagissent quasiment pas avec les cellules car les structures reconnues ne sont pas accessibles. La présence de N-glycannes de types poly-mannoses ou hybrides aurait entraîné une interaction, même faible, avec M-1. Les structures O-glycanniques sont peu présentes ou inaccessibles à la surface cellulaire car GAN-1, F-1 et F-2 présentent des signaux très faibles ou inexistantes.

Les cellules en apoptose ou mortes ont des N-glycannes dégradés, entraînant une augmentation de l'interaction avec les lectines M-1, F-1 et F-2 (Franz *et al.*, 2006). Les

CF-1 : lectine reconnaissant le core fucose	SA-1, SA-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Neu5Ac
M-1 : lectine reconnaissant des structures avec du Man	CX-1, CX-2 : lectines reconnaissant des structures complexes
GAN-1, GAN-4 : lectines reconnaissant des structures avec du GalNAc	
GA-1, GA-2, GA-4 : lectines reconnaissant des structures avec du Gal	
GUN-1, GUN-3, GUN-4 : lectines reconnaissant des structures avec du GlcNAc	
F-1, F-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Fuc	

signaux mesurés sur ces trois lectines sont faibles et nous indiquent que les cellules testées sont viables. Le profil obtenu est spécifique d'astrocytes de souris mais aucune différence entre les deux lignées n'a pu être mise en évidence, même avec la mise en présence de MSO à 10mM (figure 62).

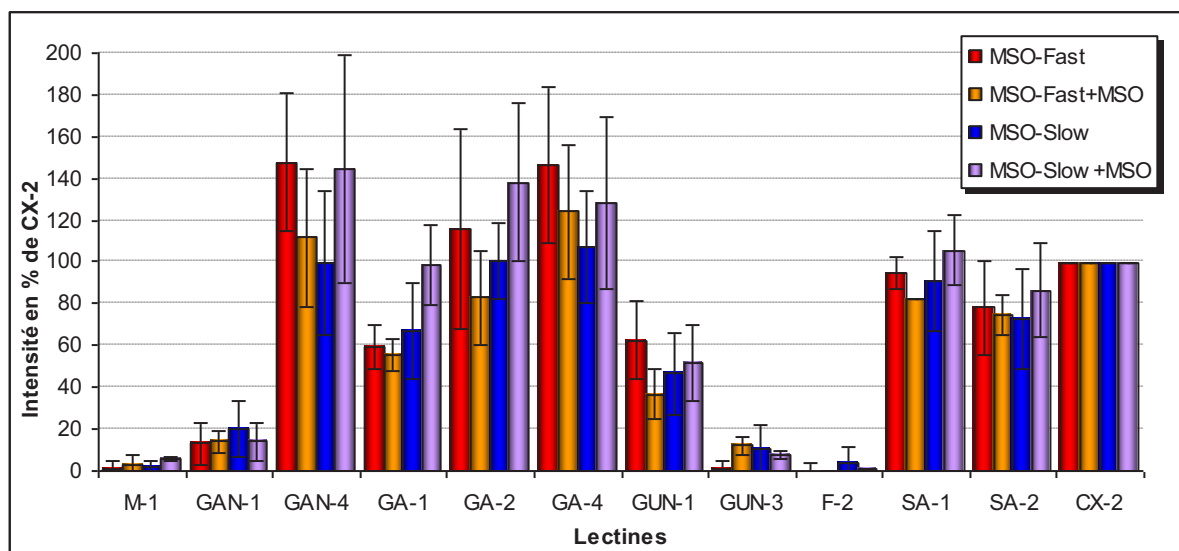


Figure 62 : Glycoprofils d'astrocytes avec ou sans MSO 10mM
Ajustement sur CX-2. Moyenne \pm SEM. n=2-5

IV - Différences métaboliques mises en évidence

Parmi les différentes études du métabolisme présentées, seul le dosage du glycogène cérébral avait été réalisé sur les souris G6 (Cloix *et al.*, 2010a). Les résultats obtenus montrent une variation identique du taux de glycogène après injection de MSO entre les souris MSO-Fast consanguines et les souris MSO-Fast G6. La variation est en revanche plus faible pour les souris MSO-Slow consanguines par rapport aux MSO-Slow G6 après injection de MSO, aussi bien à 75mg/kg qu'à 200mg/kg. Cette diminution de la variation est observée dans les mêmes proportions pour les mâles et les femelles MSO-Slow consanguines. Ces résultats montrent que les MSO-Fast consanguines sont peu différentes des MSO-Fast G6 et que la consanguinité n'a pas modifié la réponse glycogénique à la MSO. À l'inverse, l'augmentation de la pression de sélection chez les MSO-Slow a conduit à une modification de la réponse du taux de glycogène à l'injection de MSO pour cette lignée.

Les résultats des différentes études biochimiques menées montrent une différence mâles/femelles à l'intérieur de chaque lignée. L'étude du taux de glycogène révèle une différence mâle/femelle pour les MSO-Fast, que ce soit avant ou après injection d'une dose convulsivante de MSO de 75mg/kg. Les mâles MSO-Fast ont un taux de glycogène plus élevé que les femelles MSO-Fast et que les mâles et les femelles MSO-Slow avec l'injection de sérum physiologique. Un effet du sexe a déjà été mis en évidence à plusieurs reprises pour le métabolisme du Glc (Gur *et al.*, 1995 ; Hakamata *et al.*, 2009).

La voie métabolique glutamatergique, et plus particulièrement l'activité de la GS, est également affectée par la différence entre les mâles et les femelles. Le glutamate est plus affiné

CF-1 : lectine reconnaissant le core fucose	SA-1, SA-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Neu5Ac
M-1 : lectine reconnaissant des structures avec du Man	CX-1, CX-2 : lectines reconnaissant des structures complexes
GAN-1, GAN-4 : lectines reconnaissant des structures avec du GalNAc	
GA-1, GA-2, GA-4 : lectines reconnaissant des structures avec du Gal	
GUN-1, GUN-3, GUN-4 : lectines reconnaissant des structures avec du GlcNAc	
F-1, F-2 : lectines reconnaissant des structures avec du Fuc	

pour les GS des mâles que celles des femelles, aussi bien pour les MSO-Fast que pour les MSO-Slow. Toutefois, les données concernant une différence mâles/femelles pour la GS sont parfois contradictoires. Cette ambiguïté est due au fait que la plupart des études sont, d'une part, réalisées uniquement sur des mâles et, d'autres part, focalisées sur la quantité d'enzyme sans étude de l'activité. Alors que Miguel-Hidalgo n'observe aucune différence (Miguel-Hidalgo *et al.*, 2010), plusieurs études montrent l'influence d'hormones, telles que l'œstradiol ou des glucocorticoïdes, dont la quantité varie selon le sexe (Mong et Blutstein, 2006 ; Shirasawa et Yamanouchi, 1999). Il a également été démontré que l'œstradiol induisait certes une augmentation de l'expression du gène de la GS mais également une diminution de son activité (Blutstein *et al.*, 2009), ce qui pourrait expliquer l'activité plus faible des GS pour les femelles indépendamment de la lignée.

La MSO induit une variation du taux de glycogène différente chez les MSO-Slow et MSO-Fast. L'effet glycogénique de la MSO a été décrit de nombreuses fois (Bernard-Hélary *et al.*, 2000 ; Cloix et Hévor, 2009 ; Folbergrová *et al.*, 1969 ; Phelps, 1975). Cette variation est cependant supérieure chez les MSO-Fast par rapport aux MSO-Slow injectés à une dose de MSO de 75mg/kg ou de 200mg/kg. *In vitro*, l'accumulation de glycogène induite par la MSO est plus forte pour les astrocytes MSO-Slow que pour les astrocytes MSO-Fast. Les MSO-Slow sont donc capables de synthétiser et d'accumuler du glycogène. Cette hypothèse est renforcée par la cinétique des MSO-Slow injectées à 200mg/kg pour lesquelles l'accumulation de glycogène est plus importante à 4 heures qu'à 8 heures. Cependant, l'accumulation du glycogène cérébral reste plus faible chez les MSO-Slow que chez les MSO-Fast. La complexité tissulaire, et notamment les interactions entre les neurones et astrocytes pourrait expliquer la plus faible accumulation de glycogène tissulaire chez les MSO-Slow. Ainsi l'injection de MSO induirait pour les souris de cette lignée une biosynthèse de glycogène plus faible ou bien une augmentation de sa dégradation.

La concentration de glutamate synaptique est réduite après injection de MSO (Fonnum et Paulsen, 1990 ; Somers et Beckstead, 1990), indiquant qu'il est éliminé sans problème. Le recyclage reste néanmoins fortement perturbé, la GS étant inhibée par la MSO. Le cycle de Krebs constitue alors la principale voie de recyclage du glutamate, conduisant alors à la production de pyruvate (Poitry *et al.*, 2000). La FBPase, enzyme de la gluconéogenèse, a son activité augmentée après injection de MSO (Bernard-Hélary *et al.*, 2002 ; Hevor *et al.*, 1986). Cette modification de l'activité est en accord avec l'accumulation de glycogène induite par la MSO et permettrait ainsi de réduire l'excès de pyruvate produit.

La mesure des quantités d'enzymes peut permettre de comprendre certains mécanismes cellulaires mais il est également nécessaire de connaître l'activité des enzymes. L'étude de la glycosylation participe ainsi à cette démarche. Les différences mises en évidence ne sont pas suffisantes pour étayer l'une ou l'autre des hypothèses mais elles constituent un atout pour élucider les différences d'activité, aussi bien entre les mâles et les femelles, qu'entre les MSO-Slow et les MSO-Fast ou dans le mécanisme d'action de la MSO. Dans toutes ces différences, la forme glycanique supposée varier le plus est un N-glycane bi-antenné (modification de l'interaction sur M-1 et CX-2) core fucosylé (modification de l'interaction sur CF-1). La plupart de ces glycanes étant de type complexe, d'autres lectines, comme GAN-1, ont une interaction modifiée avec les échantillons extraits des souris injectées avec une dose convulsivante de MSO. Ces lectines apparaissent donc comme un bon outil pour étudier les différences d'activité de certaines enzymes entre les souris MSO-Fast et les MSO-Slow.

TROISIÈME PARTIE :
Étude de la
neurotransmission
catécholaminergique et
indolaminergique

Rôle des neurotransmetteurs monoaminés dans les crises épileptiques par mesure de treize composés de la famille des catécholamines et de la famille des indolamines.

Introduction

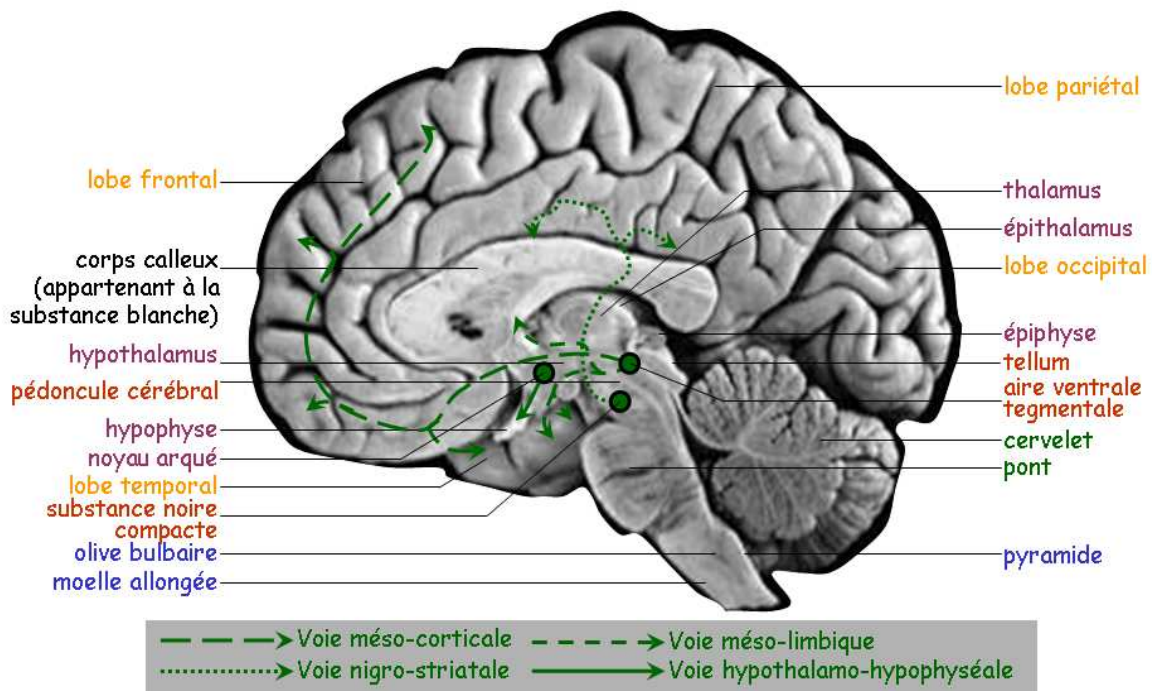
La voie de neurotransmission sérotoninergique peut être impliquée dans l'anxiété des souris MSO-Fast et la noradrénaline peut expliquer la variation du taux de glycogène après injection de MSO pour les souris MSO-Slow. La mesure des neurotransmetteurs monoaminés (sérotonine, noradrénaline, adrénaline et dopamine) doit permettre de confirmer ces hypothèses ou de les réfuter. Une mesure des précurseurs et des produits de dégradations permet de compléter la mesure des neurotransmetteurs.

I - Les neurotransmetteurs monoaminés

Les quatre neurotransmetteurs monoaminés appartiennent à la famille des catécholamines pour la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline ou à la famille des indolamines pour la sérotonine (5-HT). Mise à part une classe de récepteurs sérotoninergiques, les récepteurs des neurotransmetteurs monoaminés sont des récepteurs métabotropes à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Cette protéine G peut être différente en fonction du récepteur, permettant ainsi une action spécifique sur des cibles cellulaires.

I.A - La dopamine

I.A.1 - Localisation cérébrale des neurones dopaminergiques



zones du myélocéphale, du métencéphale, du mésencéphale, du diencéphale, du télencéphale

Figure 63 : Projections neuronales dopaminergiques dans le cerveau humain

Les neurones dopaminergiques se concentrent principalement dans trois zones : deux zones situées dans le mésencéphale (la substance noire compacte (aussi appelée *substantia nigra pars compacta*) et l'aire ventrale tegmentale), et une zone située dans le diencéphale (le noyau arqué) (figure 63).

Les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte ont des projections vers les néostriata, formés des noyaux caudés et des putamens et entourées par les lobes pariétaux et temporaux. Ils constituent la voie dopaminergique nigro-striatale. L'aire ventrale tegmentale est à l'origine de deux voies dopaminergiques, la méso-corticale et la méso-limbique. La première voie agit sur deux structures corticales, les lobes frontaux et temporaux, alors que la seconde a pour cible cinq structures sous-corticales, les hippocampes, les amygdales cérébrales, le septum, les lobes olfactifs et les noyaux accumbens. La dernière voie, hypothalamo-hypophyséale, permet un influx de l'information des neurones dopaminergiques provenant du noyau arqué vers l'hypophyse.

1.A.2 - Les récepteurs dopaminergiques

Les cinq récepteurs dopaminergiques, nommés D1 à D5, sont des récepteurs métabotropes à sept domaines transmembranaires et couplés à des protéines G. Les différentes sous-unités de récepteurs dopaminergiques forment d'abord des homodimères ou des hétérodimères qui peuvent ensuite s'associer avec d'autres récepteurs, dopaminergiques ou non (Dziedzicka-Wasylewska, 2004).

Les récepteurs D1 et D5, formant la sous-classe de type D1, sont couplés à une protéine G_s qui stimule l'adénylate cyclase. Inversement, cette enzyme peut être inhibée par une protéine G_i couplée à un des récepteurs dopaminergiques de la sous-classe de type D2, comprenant les récepteurs D2, D3 et D4. L'adénylate cyclase régule la concentration intracellulaire en cAMP, un second messager agissant notamment sur la protéine kinase A (Perreault *et al.*, 2011).

1.A.3 - Les fonctions des voies dopaminergiques

Les récepteurs dopaminergiques ont été largement étudiés en fonction de leur action sur l'adénylate cyclase car ce n'est qu'entre 1990 et 1993 que les sous-unités D3, D4 et D5 ont été découvertes. La voie hypothalamo-hypophyséale participe au contrôle de la production d'hormones par l'hypophyse (Kelly *et al.*, 1997). Les voies dopaminergiques méso-limbiques et méso-corticales interviennent dans la neuroplasticité, facilitant ainsi les processus cognitifs tels que la mémoire (González-Burgos et Feria-Velasco, 2008). Il a cependant pu être mis en évidence que les principales fonctions des voies dopaminergiques étaient l'action sur la motricité et les émotions.

Le type de motricité contrôlé diffère en fonction des régions cérébrales recevant le signal dopaminergique. La voie méso-corticale est impliquée dans la motricité liée aux émotions, comme le sourire, alors que la voie nigro-striatale est impliquée dans la motricité volontaire. Les neurones de cette seconde voie ont également un rôle protecteur contre la mort cellulaire conduisant à l'apparition de la maladie de Parkinson (Dziedzicka-Wasylewska, 2004). Certaines émotions peuvent être également régulées par un signal dopaminergique. Ainsi, la voie méso-limbique contrôle la satisfaction liée aux récompenses, qui peut

notamment conduire à une addiction (Lajtha et Sershen, 2010). La motivation est quant à elle régulée par la voie méso-corticale. Certaines formes de schizophrénie sont liées à l'une de ces deux voies dopaminergiques (Perreault *et al.*, 2011).

La voie dopaminergique a par ailleurs été impliquée dans la protection des crises épileptiques. L'administration d'antagonistes des récepteurs de type D2 ou d'agonistes des récepteurs de type D1 induit en effet des convulsions (Starr, 1996). Les crises épileptiques sont provoquées par des décharges neuronales synchrones et cette hyperactivation des neurones peut conduire à une mort cellulaire. Les neurones dopaminergiques peuvent dans certains cas jouer un rôle protecteur pour limiter la synchronisation des neurones et leur mort (Bozzi *et al.*, 2000).

I.B - L'adrénaline et la noradrénaline

L'adrénaline et la noradrénaline sont émises par des neurones différents mais ces deux neurotransmetteurs se fixent sur les mêmes récepteurs.

I.B.1 - Localisation cérébrale des neurones adrénérgiques et noradrénérgiques

Le cerveau possède un plus grand nombre de neurones noradrénérgiques que de neurones adrénérgiques (figure 64).

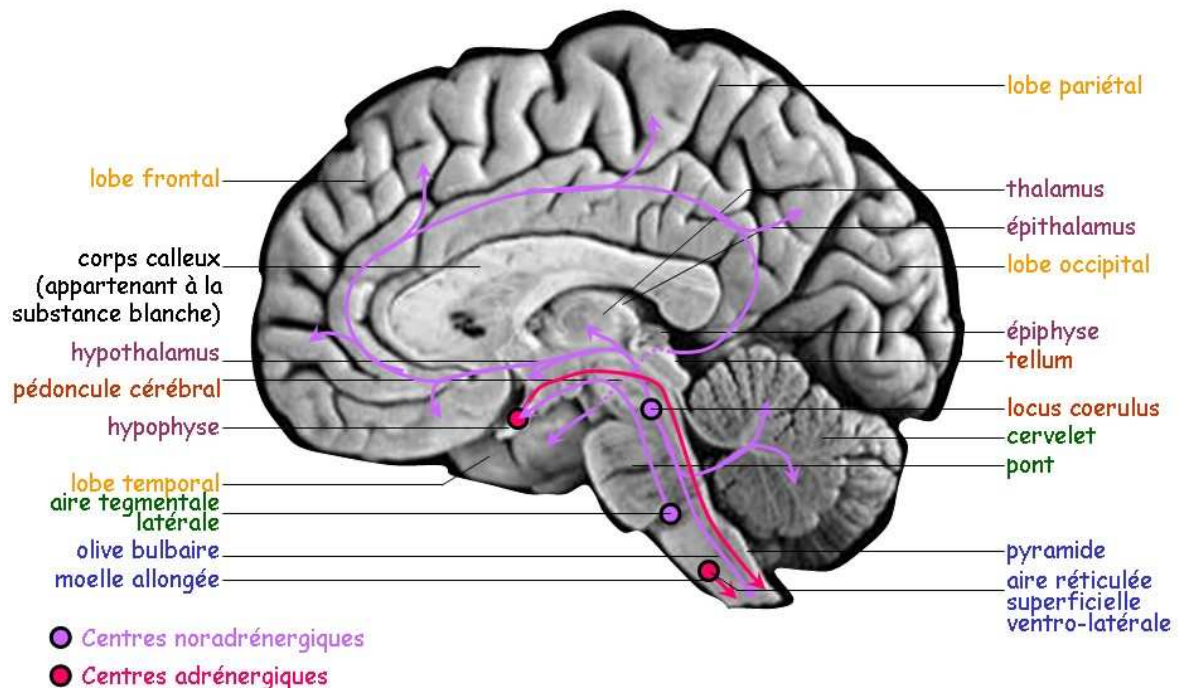


Figure 64 : Projections neuronales adrénérgiques et noradrénérgiques dans le cerveau humain

Les neurones adrénérgiques n'influent sur aucune zone cérébrale, contrairement aux autres voies de neurotransmission, et leurs prolongements permettent de réguler d'autres parties du corps humain. Les corps cellulaires sont localisés dans deux centres, l'hypophyse et

l'aire réticulée superficielle ventro-latérale, située dans la moelle allongée. L'activité des neurones adrénérgiques de l'hypophyse est régulée notamment par la voie noradrénérgique dont les neurones proviennent de l'aire tegmentale latérale.

Les autres voies noradrénérgiques prennent toutes leur source dans le *locus coeruleus*. La première régule différentes zones du mésencéphale, du diencephale et du télencéphale alors que la deuxième voie ne participe qu'à la régulation dans le cervelet. Les neurones de la troisième voie se prolongent uniquement dans la moelle épinière.

I.B.2 - Les récepteurs adrénérgiques

Les récepteurs adrénérgiques peuvent interagir avec l'adrénaline et la noradrénaline mais il existe une préférence pour un des deux neurotransmetteurs en fonction du type de récepteur. Les récepteurs adrénérgiques sont au nombre de cinq et sont tous couplés à une protéine G, qui peut être différente en fonction du type de récepteur (tableau 26).

Tableau 26 : Préférence des différents récepteurs adrénérgiques et protéines G associées

Récepteur	Protéine G associée	Préférence
$\alpha 1$	G_q , activité de la phospholipase C	noradrénaline
$\alpha 2$	G_i , inhibition de l'adénylate cyclase	adrénaline
$\beta 1$	G_s , stimulation de l'adénylate cyclase	aucune
$\beta 2$	G_s , stimulation de l'adénylate cyclase	adrénaline
$\beta 3$	G_s , stimulation de l'adénylate cyclase	noradrénaline

Tous les récepteurs sont présents au niveau du système nerveux central mais leurs densités et leurs localisations varient. Les récepteurs $\alpha 2$ sont par exemple essentiellement situés dans l'hypophyse. Exprimés à la surface des boutons pré-synaptiques des neurones noradrénérgiques, ils permettent un rétro-contrôle des neurones adrénérgiques de l'hypophyse sur le signal noradrénérgique (Clark *et al.*, 2008).

I.B.3 - Les fonctions des voies adrénérgiques et noradrénérgiques

Les neurones adrénérgiques et noradrénérgiques agissent principalement sur des processus non-cérébraux, comme la contraction musculaire, la glycogénolyse hépatique, la production d'adrénaline par les glandes surrénales et la lipolyse adipocytaire. La noradrénaline a également été impliquée dans certaines fonctions cérébrales.

Les récepteurs adrénérgiques ne participent pas directement à une fonction cérébrale mais contrôlent plutôt les neurones principalement impliqués dans ces fonctions et notamment l'apprentissage et l'anxiété. Cette régulation a été mise en évidence pour l'anxiété et a servi de cible à de nouveaux traitements, par exemple contre la schizophrénie avec la clozapine (Marcus *et al.*, 2010). La noradrénaline intervient également dans le contrôle de l'attention et facilite ainsi l'apprentissage (Gibbs et Summers, 2002).

La principale cible cérébrale de la noradrénaline reste néanmoins les récepteurs adrénérgiques astrocytaires. Ils interviennent dans la régulation de plusieurs voies métaboliques et de signalisation astrocytaires (Laureys *et al.*, 2010). Les signaux

noradrénergiques permettent ainsi aux astrocytes d'assurer efficacement leurs rôles neuroprotecteur et anti-inflammatoire (Gavrilyuk *et al.*, 2002). L'activation des récepteurs adrénergiques β par la noradrénaline conduit également à une meilleure prolifération astrocytaire et une meilleure organisation de la cellule en forme étoilée (Abe et Saito, 1997). La noradrénaline possède enfin une action sur le métabolisme glycogénique. Il a d'abord été démontré que ce neurotransmetteur augmentait l'activité de la glycogène phosphorylase, l'enzyme principalement responsable de la dégradation du glycogène (Cummins *et al.*, 1983). Plus récemment, le rôle de la noradrénaline dans la synthèse de glycogène a été mis en évidence (Allaman *et al.*, 2000).

I.C - La sérotonine

I.C.1 - Localisation cérébrale des neurones sérotoninergiques

La muqueuse gastro-intestinale contient à elle seule 80% de la 5-HT présente dans le corps humain. Cependant, les neurones sérotoninergiques participent au contrôle de nombreuses régions cérébrales, notamment au niveau du télencéphale (figure 65).

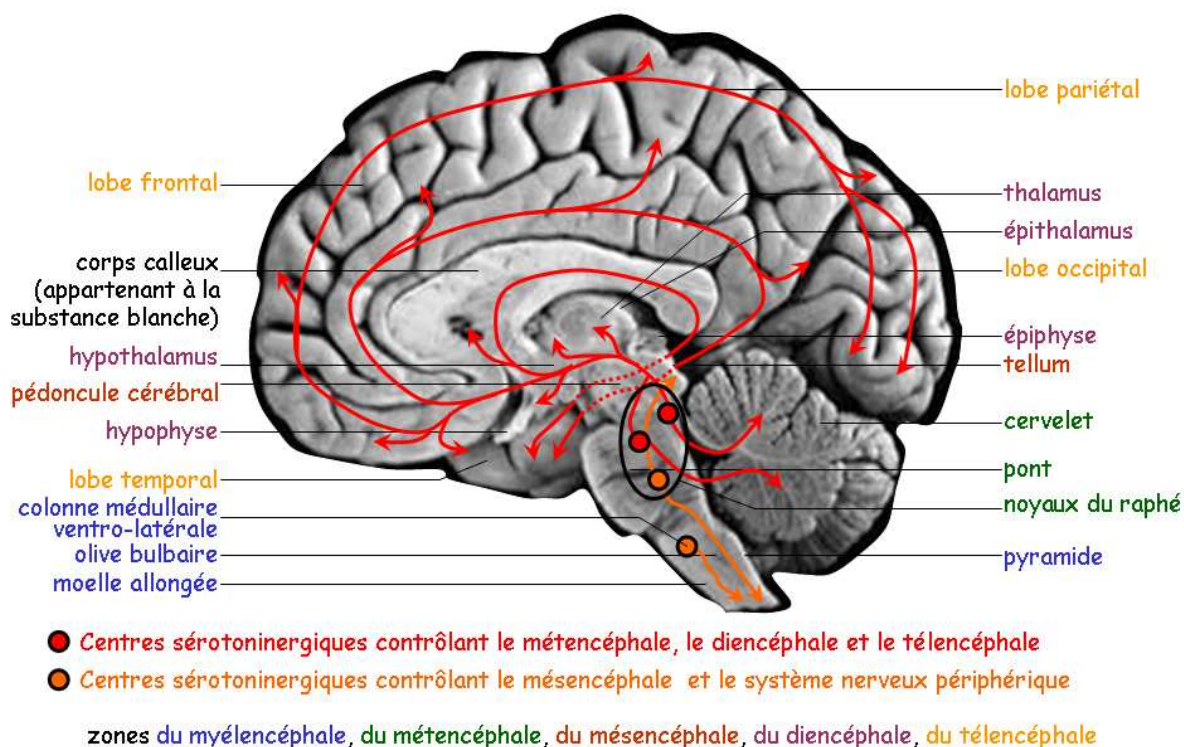


Figure 65 : Projections neuronales sérotoninergiques dans le cerveau humain

Les principaux foyers de neurones sérotoninergiques se situent dans le raphé et possèdent des projections vers le cerveau. Les autres foyers, situés dans la colonne médullaire ventro-latérale, se projettent vers la moelle épinière (Rice *et al.*, 2009). Il existe quatre voies sérotoninergiques ayant pour origine le raphé et se dirigeant vers le cerveau. Le cervelet possède deux voies afférentes distinctes et la voie afférente du tellum provient d'un autre noyau du raphé. La quatrième voie est plus complexe. Elle a pour origine plusieurs noyaux et dessert les principales zones du diencéphale et du télencéphale, faisant de la 5-HT un élément important de la neuromodulation.

I.C.2 - Les récepteurs sérotoninergiques

Divisés en sept types nommés 5-HT₁ à 5-HT₇, les récepteurs sérotoninergiques sont métabotropes, à l'exception des récepteurs 5-HT₃ qui sont ionotropes. Le récepteur 5-HT₃ est un pentamère ayant une organisation similaire aux récepteurs GABA_A et cholinergiques nicotiniques. Il existe cinq sous-unités différentes, nommées 5-HT_{3A} à 5-HT_{3E}, mais seules les sous-unités 5-HT_{3A} peuvent s'associer entre elles pour former un homopentamère. Les hétéropentamères sont constitués d'au moins une sous-unité 5-HT_{3A}, laissant supposer que cette sous-unité est nécessaire à la fonctionnalité du récepteur ionotrope (Barnes *et al.*, 2009). La fixation de 5-HT sur ces récepteurs entraîne une entrée post-synaptique de cations. La perméabilité au sodium est identique à tous les récepteurs alors que la perméabilité au calcium dépend de la composition du récepteur et notamment de la présence de sous-unités 5-HT_{3B} (Davies *et al.*, 1999).

Les treize autres récepteurs sérotoninergiques sont métabotropes et couplés à différentes protéines G. Plusieurs récepteurs peuvent appartenir au même type (tableau 27).

Tableau 27 : Récepteurs métabotropes sérotoninergiques

Type	Sous-type	Protéine G associée	Remarque
5-HT ₁	A, B, D, E, F	G _i , inhibition de l'adénylate cyclase	5-HT _{1C} renommé 5-HT _{2C}
5-HT ₂	A, B, C	G _q , activité de la phospholipase C	après séquençage du gène
5-HT ₄		G _s , stimulation de l'adénylate cyclase	
5-HT ₅	A, B	G _i , inhibition de l'adénylate cyclase	5-HT _{5B} absent chez l'homme
5-HT ₆		G _s , stimulation de l'adénylate cyclase	
5-HT ₇		G _s , stimulation de l'adénylate cyclase	

Les différents types et sous-types de récepteurs sont tous présents au niveau du cerveau et peuvent être exprimés avec des variantes au niveau de l'épissage. L'association avec des protéines G différentes leur donne leurs spécificités. Les récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₅ ont ainsi un effet inhibiteur de la neurotransmission alors que les 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇ ont un effet excitateur. Certains récepteurs sérotoninergiques peuvent être astrocytaires, notamment les récepteurs 5-HT₂ (Peng *et al.*, 2010).

I.C.3 - Les fonctions des voies sérotoninergiques

La sérotonine agit principalement au niveau du système nerveux périphérique. Ce neurotransmetteur est principalement impliqué dans la régulation de la pression artérielle et le fonctionnement du tube digestif. La distribution des neurones sérotoninergiques vers un grand nombre de zones du cerveau explique que la 5-HT intervienne dans plusieurs fonctions cérébrales. Le tableau 28 décrit les principales implications de chaque récepteur sérotoninergique.

Tableau 28 : Principales fonctions des récepteurs sérotoninergiques

Récepteur	Fonctions	Références
5-HT _{1A}	anxiété, appétit, apprentissage, autorégulation sérotoninergique, comportement sexuel, humeur, mémoire, neuroplasticité, neuroprotection, satisfaction liée aux récompenses, sommeil, thermorégulation, vasoconstriction	(Bert <i>et al.</i> , 2008 ; Pucadyil <i>et al.</i> , 2005)
5-HT _{1B}	anxiété, appétit, apprentissage, autorégulation sérotoninergique, comportement sexuel, humeur, mémoire, satisfaction liée aux récompenses, vasoconstriction	(Drago <i>et al.</i> , 2010 ; Pullar <i>et al.</i> , 2004)
5-HT _{1D}	anxiété, autorégulation sérotoninergique, humeur, mémoire, vasoconstriction	(Pullar <i>et al.</i> , 2004)
5-HT _{1E}	vasoconstriction au niveau périphérique mais aucun rôle déterminé au niveau central	(Granados-Soto <i>et al.</i> , 2010)
5-HT _{1F}	vasoconstriction	(Ahn <i>et al.</i> , 2009)
5-HT _{2A}	anxiété, appétit, comportement sexuel, humeur, mémoire, satisfaction liée aux récompenses, sommeil, thermorégulation, vasodilatation	(Capuano <i>et al.</i> , 2010 ; Landolt et Wehrle, 2009 ; Popova et Amstislavskaya, 2002)
5-HT _{2B}	anxiété, appétit, développement cérébral, sommeil, vasodilatation	(Duxon <i>et al.</i> , 1997 ; Landolt et Wehrle, 2009 ; Nebigil <i>et al.</i> , 2001 ; Popa <i>et al.</i> , 2005)
5-HT _{2C}	anxiété, appétit, comportement sexuel, humeur, mémoire, satisfaction liée aux récompenses, sommeil, vasodilatation, thermorégulation	(Landolt et Wehrle, 2009 ; Mazzola-Pomietto <i>et al.</i> , 1997 ; Popova et Amstislavskaya, 2002)
5-HT ₃	anxiété, appétit, humeur, mémoire, satisfaction liée aux récompenses, vasodilatation	(Thompson et Lummis, 2006)
5-HT ₄	anxiété, appétit, apprentissage, humeur, mémoire, neuroprotection, respiration, satisfaction liée aux récompenses	(Francis <i>et al.</i> , 2011 ; King <i>et al.</i> , 2008 ; Lucas <i>et al.</i> , 2007 ; Manzke <i>et al.</i> , 2003)
5-HT _{5A}	anxiété, appétit, humeur, locomotion, mémoire, rythme circadien	(Wesolowska, 2002)
5-HT _{5B}	pas de fonction formellement identifiée	(Wesolowska, 2002)
5-HT ₆	anxiété, appétit, apprentissage, humeur, mémoire	(Wesolowska, 2002 ; Wesolowska, 2010)
5-HT ₇	anxiété, appétit, humeur, mémoire, rythme circadien, sommeil, thermorégulation, vasodilatation, satisfaction liée aux récompenses	(Matthys <i>et al.</i> , 2011 ; Wesolowska, 2002)

Les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont très répandus dans le cerveau contrairement au récepteur 5-HT_{1D}, ce qui explique qu'il soit impliqué dans moins de fonctions (Pullar *et al.*, 2004). Plusieurs récepteurs, comme les 5-HT_{1F} et 5-HT_{1E}, ont été moins étudiés car il n'existe que peu ou pas d'agonistes ou d'antagonistes de ces récepteurs (Granados-Soto *et al.*, 2010). Très peu d'études ont par ailleurs été faites sur le récepteur 5-HT_{5B} car il n'existe pas de récepteurs fonctionnels chez l'Homme (Wesolowska, 2002).

Les recherches se sont essentiellement portées sur les deux principales fonctions connues des récepteurs sérotoninergiques, la vasoconstriction et le contrôle de la digestion afin de développer des médicaments contre les maladies associées à ces fonctions, notamment la migraine et les vomissements provoqués par les chimiothérapies. Les récepteurs sérotoninergiques sont néanmoins ciblés également pour des neuropathologies liées à l'anxiété et à l'humeur, comme la schizophrénie. De plus, plusieurs récepteurs ont été impliqués dans l'apparition de convulsions, parmi lesquels 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C} et 5-HT₇. (Landolt et Wehrle, 2009 ; Matthys *et al.*, 2011 ; Stefulj *et al.*, 2010).

II - Les voies métaboliques des monoamines

Les catécholamines et les indolamines possèdent des voies métaboliques propres à chacune. La quantité de neurotransmetteurs libérée dans la fente synaptique dépend de trois facteurs que sont la capacité de biosynthèse, la capacité de dégradation et la capacité de transport du neurone pré-synaptique.

II.A - La voie métabolique des catécholamines

Les neurotransmetteurs catécholaminergiques sont biosynthétisés à partir de trois acides aminés, la phénylalanine, la tyrosine et la DOPA (figure 66).

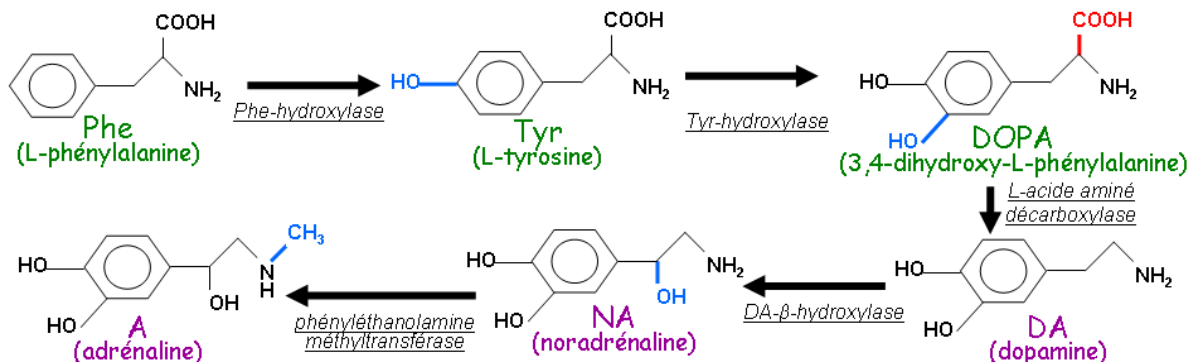


Figure 66 : Biosynthèse des neurotransmetteurs catécholaminergiques avec leurs abréviations
 Les précurseurs sont en vert et les neurotransmetteurs en violet. Les fonctions en bleu correspondent aux fonctions ajoutées par la réaction enzymatique précédente et celles en rouge sont éliminées à la réaction enzymatique suivante.

La biosynthèse des trois neurotransmetteurs fait intervenir des enzymes spécifiques mais leurs dégradations n'est réalisée principalement que par quatre enzymes : l'alcool déshydrogénase (ADH), l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), la catéchol O-méthyltransférase (COMT) et la monoamine oxygénase (MAO). Chaque neurotransmetteur peut être initialement dégradé par la COMT ou la MAO (figures 67 et 68).

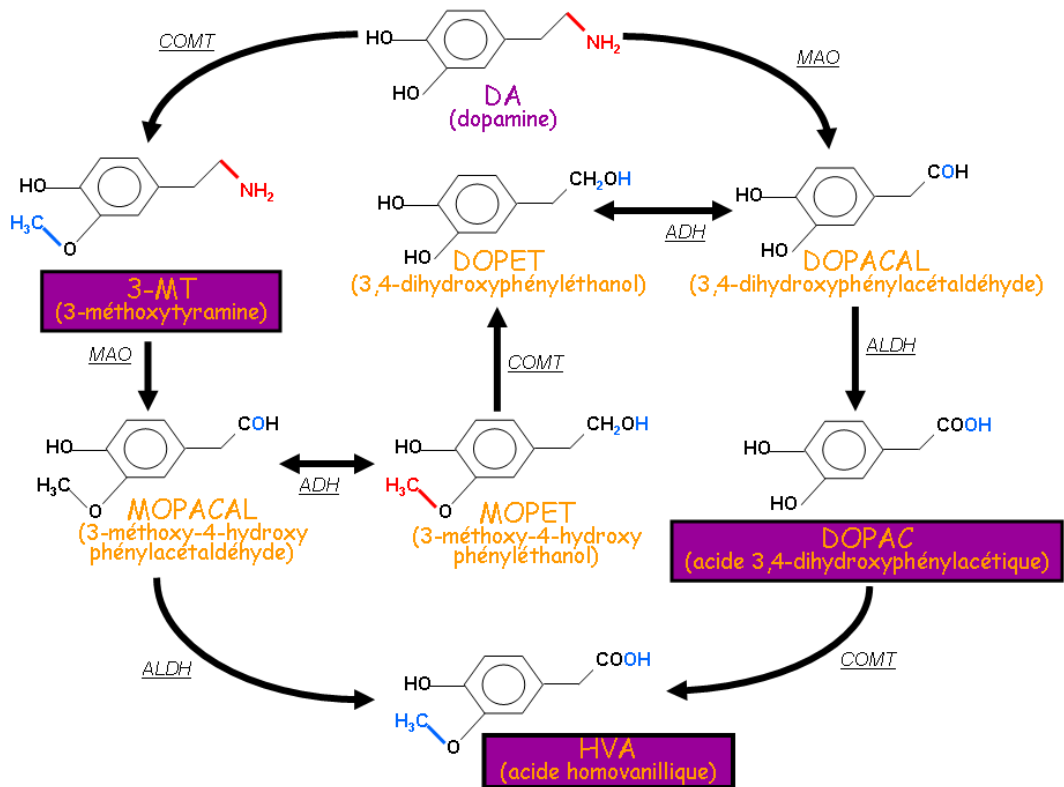


Figure 67 : Catabolisme de la dopamine et abrégations des produits de dégradation

Les noms des produits de dégradation les plus intéressants à analyser sont encadrés. Les fonctions en bleu correspondent aux fonctions ajoutées par la réaction enzymatique précédente et celles en rouge sont éliminées à la réaction enzymatique suivante. ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, COMT : catéchol O-méthyltransférase, MAO : monoamine oxydase

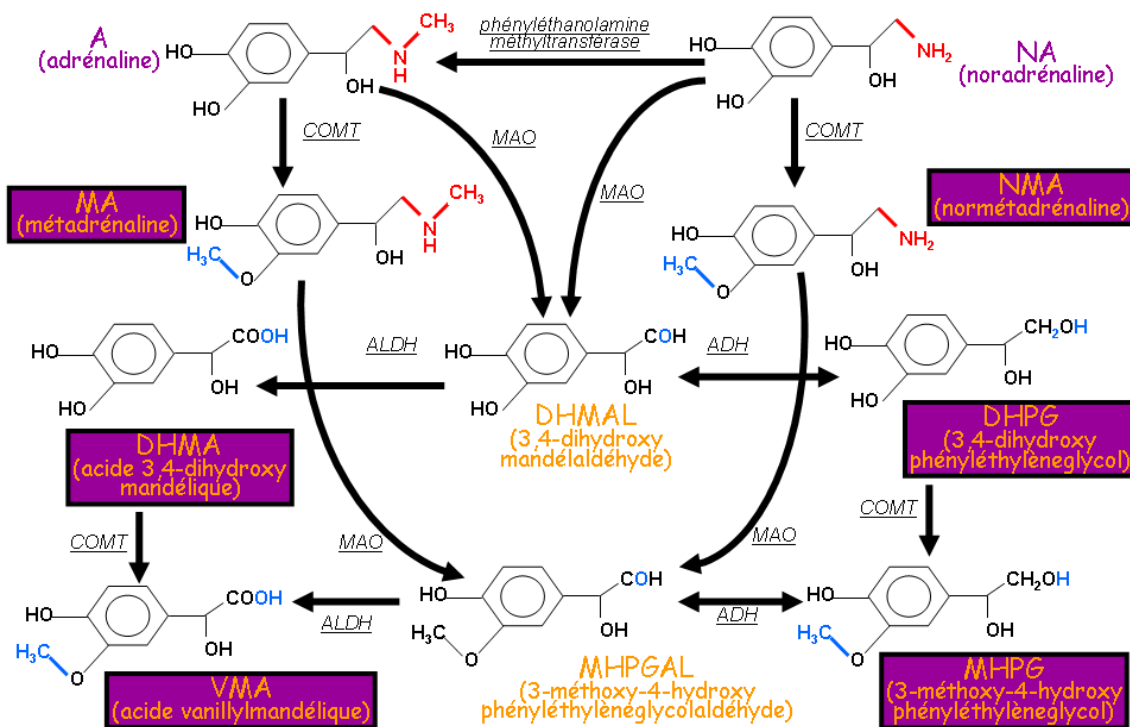


Figure 68 : Catabolisme de la noradrénaline et de l'adrénaline et abrégations des produits de dégradation

Les noms des produits de dégradation les plus intéressants à analyser sont encadrés. Les fonctions en bleu correspondent aux fonctions ajoutées par la réaction enzymatique précédente et celles en rouge sont éliminées à la réaction enzymatique suivante. ADH : alcool déshydrogénase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, COMT : catéchol O-méthyltransférase, MAO : monoamine oxydase

Bien qu'il y ait plusieurs voies de dégradations possibles, la dégradation des neurotransmetteurs est essentiellement réalisée par la MAO car la COMT n'est pas présente au niveau des neurones (Eisenhofer *et al.*, 2004). En effet, les neurotransmetteurs sont en majorité dégradés au niveau du cytoplasme du bouton pré-synaptique, soit après recapture, soit après diffusion passive à travers la membrane vésiculaire. Les aldéhydes produits par la MAO sont très instables et sont donc rapidement dégradés par l'ALDH ou l'ALDH respectivement en alcool ou en acide. Le VMA est le produit final de dégradation de la NA et l'A alors que l'HVA est le dernier produit issu de la dégradation de la DA. Le VMA et l'HVA sont en effet facilement éliminable par la voie urinaire.

II.B - La voie métabolique des indolamines

La voie métabolique de la sérotonine est plus simple que celle des neurotransmetteurs catécholaminergiques mais il existe néanmoins plusieurs similarités entre les deux voies métaboliques.

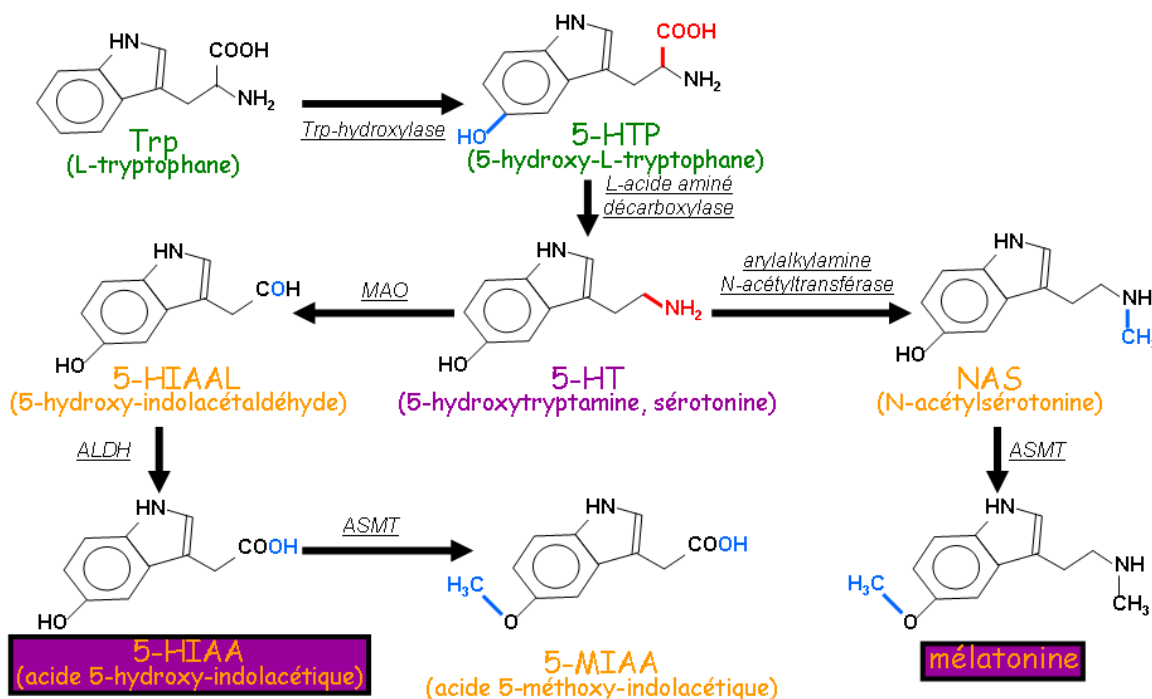


Figure 69 : Métabolisme de la sérotonine et abréviations des produits de dégradation

Les précurseurs sont en vert, le neurotransmetteur en violet et les produits de dégradation en orange. Les noms des produits de dégradation les plus intéressants à analyser sont encadrés. Les fonctions en bleu correspondent aux fonctions ajoutées par la réaction enzymatique précédente et celles en rouge sont éliminées à la réaction enzymatique suivante. ALDH : aldéhyde déshydrogénase, MAO : monoamine oxydase, ASMT : N-acétylsérotinine O-méthyltransférase

Le seul neurotransmetteur de la famille des indolamines, la 5-HT, provient d'acides aminés, le Trp et le 5-HTP (figure 69). Deux enzymes participant au catabolisme des neurotransmetteurs catécholaminergiques interviennent également pour la dégradation de la 5-HT. Il s'agit de l'ALDH et de la MAO. Une troisième enzyme, la N-acétylsérotinine O-méthyltransférase (ASMT), permet l'ajout d'un groupement méthyle sur l'oxygène du carbone 5, réalisant ainsi la même réaction enzymatique que la COMT pour les catécholamines.

À la différence des catécholamines, l'excès de sérotonine est rapidement éliminé. En effet, après transformation de la 5-HT en aldéhyde par la MAO, cette molécule, instable, est rapidement dégradé en 5-HIAA par l'ALDH. La plus grande quantité de cet acide est éliminée par voie urinaire alors que la méthylation par l'ASMT est largement minoritaire. La transformation *in fine* en mélatonine est également minoritaire et très contrôlée car il s'agit d'une neurohormone. Cette transformation a donc pour but d'obtenir un produit avec une activité biologique et non de dégrader et d'éliminer l'excès de sérotonine.

III - L'analyse des neurotransmetteurs monoaminés

III.A - Les principales méthodes d'analyse des monoamines

Pour analyser les différents composés, il faut non seulement choisir la méthode de séparation des composés mais également la méthode de détection qui sera associée. Il est parfois nécessaire de dériver les molécules à analyser pour les séparer. Cette opération présente des inconvénients majeurs tels que l'ajout d'au moins une étape à l'analyse et une augmentation de la complexité de l'analyse. Une méthode d'analyse ne nécessitant pas de dérivation préalable sera donc privilégiée.

La chromatographie en phase gazeuse (GC) permet de séparer des composés qui sont volatils. Associée avec la spectrométrie de masse (MS), la GC permet de détecter et de quantifier des produits à des concentrations de l'ordre du pg/ml. Les catécholamines ne sont pas volatiles et une dérivation est donc nécessaire pour pouvoir les analyser par cette méthode. Plusieurs protocoles ont été mis au point pour dériver les catécholamines et les séparer par GC (Fauler *et al.*, 1997 ; Zoerner *et al.*, 2011). Néanmoins, cette technique, bien qu'elle soit utilisée pour le diagnostic de certaines maladies, ne sera pas privilégiée lors de notre étude.

L'électrophorèse capillaire (CE) constitue la deuxième méthode d'analyse. Les monoamines étant le plus souvent ionisées, des protocoles de séparation par CE ont donc été mis au point. Cette technique offre une bonne résolution dans la séparation des composés avec une rapidité et une faible quantité d'échantillon nécessaire. Il existe quatre modes de CE, utilisés en fonction du type d'échantillon à analyser, qui sont l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), l'électrophorèse capillaire micellaire (MEKC), la chromatographie électrocinétique à micro-émulsion (MEEKC) et la CE non-aqueuse (NACE) (Zhou *et al.*, 2008). Les principaux modes de détections associés avec la CE sont l'ultra-violet (UV), la fluorescence induite par laser (LIF) et la MS.

Chaque mode de détection présente des avantages et des inconvénients pour une séparation par CE. Ainsi, l'avantage de certains modes de détection, comme l'UV ou la MS, est de ne pas nécessiter de dérivation des monoamines alors que d'autres, comme le LIF, ont pour principal avantage l'utilisation d'un montage relativement simple. Cette simplicité d'utilisation couplée à une plus grande sensibilité de détection fait de la LIF le mode de détection le plus utilisé avec une séparation par CE. La CE permet une analyse de petits volumes, ce qui peut être intéressant si la quantité d'échantillon est très faible, mais conduit également à une limite de détection des produits qui est au minimum de l'ordre du ng/ml et peut même être facilement cent fois supérieure en fonction du composé à analyser, et ce quel que soit le mode

de détection. La CE n'est donc pas une technique privilégiée pour l'analyse des neurotransmetteurs monoaminés.

La troisième technique de séparation des monoamines, et la plus utilisée, est la chromatographie en phase liquide (LC). Plusieurs modes de séparation ont été utilisés pour l'analyse par LC, avec une limite de détection pouvant être de l'ordre du pg/ml (Sharabi *et al.*, 2008).

III.B - La chromatographie liquide (LC)

III.B.1 - Les modes de séparation en LC

Un mode de séparation en LC est constitué de deux paramètres, le type d'interaction et les conditions de séparation. De nombreuses avancées technologiques ont permis d'améliorer plusieurs aspects du deuxième paramètre. La mise au point de systèmes pouvant supporter des pressions de plus en plus fortes, d'abord avec la chromatographie à haute pression (HPLC) puis avec la chromatographie à ultra haute pression (UPLC), a permis de réduire considérablement le temps d'analyse par échantillons (Ji *et al.*, 2010). En parallèle, la miniaturisation des systèmes a fait l'objet de recherches afin de limiter la consommation en solvant. D'une part les colonnes utilisées sont plus petites (avec des diamètres internes de colonne pouvant être inférieurs à 1mm) et d'autre part les systèmes d'injections peuvent délivrer des volumes de l'ordre du nl, d'où la technique de nanoLC (Cappiello *et al.*, 2001). Le type d'interaction est quant à lui défini par rapport aux propriétés des molécules à analyser, ici des monoamines. Celles-ci sont essentiellement analysées par LC en phase inverse, échange d'ions ou appariements d'ions.

La LC en phase inverse peut être réalisée avec des colonnes soit de silice greffées de carbone (C18, C30, ...) soit en carbone graphite poreux. Les phases mobiles nécessaires à l'éluion des composés sont alors différentes mais leur composition doit toujours être réalisée en fonction du mode de détection choisie. Ainsi 23 composés dont 16 de la famille des monoamines ont pu être séparés et analysés par LC en phase inverse avec une colonne greffée en C18 à partir d'échantillons d'urine (Bourcier *et al.*, 2006).

La LC par échange d'ions permet une séparation de molécules chargées. Pour les monoamines, la plupart des protocoles de séparation utilisent une phase stationnaire chargée négativement pour une interaction avec les fonctions amines des molécules à séparer (Wang *et al.*, 2007a). La LC par appariement d'ions est quant à elle utilisée pour séparer des composés peu retenus en phase inverse. Une molécule composée d'une chaîne carbonée hydrophobe et d'une partie ionique est ajoutée dans la phase mobile. Il s'agit le plus souvent d'une chaîne de 8 carbones avec un groupement sulfate ou sulfonate. La partie hydrophobe peut interagir avec la phase stationnaire, essentiellement avec des colonnes greffées en C18, alors que la partie ionique peut interagir avec les monoamines (Chirita, 2009).

L'avantage de cette technique par rapport à l'échange d'ions est la séparation des produits de dégradation des neurotransmetteurs catécholaminergiques. En effet, aussi bien certains produits issus de la dégradation de la DA, tels que l'HVA, que d'autres issus de la dégradation de la NA et l'A, tels que le VMA, ne présentent pas de fonction amine. En LC par

appariement d'ion, ces composés peuvent encore être retenus sur la phase stationnaire par les chaînes de C18.

III.B.2 - Les modes de détection en LC

Plusieurs techniques permettent de détecter les monoamines après séparation par LC. La détection est principalement réalisée par MS ou détection électrochimique (ECD), alors que les détections par UV ou fluorescence restent moins utilisées. En effet, la détection par UV est moins sensible, avec des limites de détection de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$, et la détection par fluorescence nécessite une étape préalable de dérivation.

La MS permet d'obtenir de nombreuses informations lors de la détection des composés, telles que la masse moléculaire des composés mais également certains éléments structuraux. Ces informations sont par ailleurs complémentaires de celle obtenue par LC, à savoir le temps de rétention du composé. Cette technique facilite donc l'analyse des monoamines dans des milieux complexes tels que les extraits tissulaires (Chirita *et al.*, 2011). L'appareillage étant composé de deux éléments distincts (la source d'ionisation et le détecteur), de nombreux protocoles ont pu être mis au point pour l'étude des monoamines. Cependant, les limites de détection avec la MS restent de l'ordre du ng/ml , même si récemment des résultats ont été obtenus avec des composés présents dans des échantillons avec des concentrations de l'ordre du pg/ml .

L'utilisation de la ECD est possible pour les monoamines car leurs noyaux aromatiques possèdent une fonction amine ou des groupements hydroxyles substitués. Ces fonctions chimiques font des monoamines des molécules facilement oxydables qui peuvent être analysées spécifiquement avec un potentiel de tension appliqué au niveau du détecteur. Le second avantage de l'ECD réside dans sa grande sensibilité, avec des limites de détection de l'ordre du pg/ml (Sharabi *et al.*, 2008).

Le nombre d'échantillons à analyser étant important, la technique retenue doit être assez simple. La séparation par LC, associée avec une ECD, apparaît comme la meilleure technique, avec des limites de détection très faibles permettant l'étude d'échantillons complexes. L'HPLC par appariement d'ions est choisie pour permettre une étude d'un maximum de produits de dégradations des neurotransmetteurs monoaminés.

Matériels et méthodes

I - Les réactifs

Ceux-ci sont donnés dans le tableau page 12.

II - Les animaux

Pour chaque expérimentation menée, les souris utilisées ont un niveau de sélection identique (présenté en introduction générale chapitre IV, pages 26 à 29) entre les lignées MSO-Slow et MSO-Fast. Les souris utilisées pour la première série de résultats sont issues de 6 croisements avec sélection par la MSO (génération G6), alors que celles utilisées pour la seconde série de résultats sont issues de 10 croisements avec sélection par la MSO puis 5 à 7 croisements consanguins (génération C6). Les souris de génération C6 sont considérées comme consanguines avec des caractères génétiques quasiment fixés aussi bien pour la lignée MSO-Slow que pour la lignée MSO-Fast. Les souris, mâles et femelles confondus, sont âgées de $78,2 \pm 21,6$ jours au moment de l'expérience.

Les souris sont élevées à une température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ avec une luminosité artificielle par néon de 7h30 à 19h30. L'eau et la nourriture sont accessibles *ad libitum*. Les expérimentations sont menées à la même lumière artificielle et à la même température que celle des box d'élevage.

Chaque étude a été menée de manière éthique en respectant la Directive du Conseil Européen du 24 novembre 1986 (86/609/ECC) avec l'autorisation du comité éthique local (agrément CREEA n°CL2007-023).

III - Injections de la méthionine sulfoximine

La MSO est d'abord dissoute dans du sérum physiologique (solution 0,9% NaCl) à 7,5mg/ml pour une dose de 75 mg/kg ou à 20mg/ml pour une dose de 200mg/kg.

Les souris MSO-Fast reçoivent une dose de 75mg/kg tandis que les MSO-Slow reçoivent une dose de 75mg/kg ou de 200mg/kg. Comme le montre les résultats précédents (figures 16 et 17, pages 54 et 55), la dose de 75mg/kg est subconvulsivante pour les MSO-Fast mais ne provoque que peu d'effet chez les souris MSO-Slow. Aucune dose n'étant subconvulsivante chez MSO-Slow, celle à 200mg/kg apparaît comme un bon compromis car toutes les souris atteignent en effet le stade IV sur l'échelle de Racine (Racine, 1972) à cette dose (stade précédant les convulsions généralisées) avec un fort taux de survie dans le temps, contrairement aux souris injectées à 350mg/kg dont le taux de mortalité est de 60% à 10 heures.

Toutes les injections sont réalisées en intra-péritonéal par le même manipulateur, entre 8h et 12h30 pour éviter au maximum l'effet du cycle circadien. Le volume injecté correspond à 10µl par gramme de souris et l'utilisation de seringues de 500µl permet une précision au ½ gramme de souris près.

Les souris témoins utilisées pour cette étude sont injectées dans les mêmes conditions avec du sérum physiologique.

IV - Sacrifice des animaux et récupération du cortex

Les analyses biochimiques cérébrales imposent plusieurs contraintes quant à la méthode de sacrifice des animaux et à la conservation des échantillons. La décapitation est une des trois méthodes éthiques de sacrifice, avec la dislocation de la colonne vertébrale et le four micro-onde, qui n'altère pas les voies cérébrales métaboliques et de signalisation. Le sacrifice par micro-ondes nécessite un équipement adapté et du personnel formé. Le sacrifice par décapitation est privilégié par rapport à la dislocation de la colonne vertébrale pour limiter la dégradation des neurotransmetteurs après la mort de l'animal. Afin de réduire au maximum cette dégradation, les têtes sont immédiatement plongées dans de l'azote liquide après la décapitation.

Des souris sont sacrifiées immédiatement, à 4h, 8h, 24h et 48h après l'injection de MSO ou de sérum physiologique. Des souris MSO-Fast consanguines sont également sacrifiées à 2h mais aucune à 48h. Pour les lignées de la génération G6, 5 mâles et 5 femelles sont injectés à la MSO pour chaque temps et chaque cortex de souris est traité séparément. Pour les lignées consanguines, 10 mâles et 10 femelles sont injectés à la MSO pour chaque temps et répartis dans 2 groupes de 3 souris et 2 groupes de 2 souris pour chaque sexe.

La dissection des têtes pour la récupération du cortex cérébral est réalisée sur azote liquide suivant la méthode décrite par Glowinski (Glowinski et Iversen, 1966). Après le broyage de tissu à l'aide d'un homogénéiseur, la poudre obtenue est conservée à -20°C. À chaque fois que la poudre est sortie du congélateur, celle-ci est immédiatement placée dans de l'azote liquide. Un contrôle visuel permet de vérifier le bon état de congélation de la poudre.

V - Extraction tissulaire

Le dosage des monoamines est réalisé sur environ 80mg de poudre issue de cortex préparée selon le protocole décrit précédemment. Pour 1mg de tissus, un volume de 5µl d'HClO₄ 0,2N est ajouté. L'homogénéisation est réalisée à l'Ultra-Turrax (Ultra-Turrax T8, Ika Labotechnik) 30 secondes à puissance 3 puis 30 secondes à puissance 5 en conservant l'échantillon dans la glace. Un prélèvement de 20µl est réalisé pour le dosage protéique. Après une centrifugation de 30 minutes à 30000 g à 4°C, le surnageant est récupéré.

Le dosage protéique est réalisé en microplaque avec du réactif de Bradford commercial permettant de quantifier les protéines dans un échantillon. Le principe repose sur l'interaction du colorant, bleu de Coomassie G-250, avec certains acides aminés des protéines (essentiellement l'arginine et dans une moindre mesure la lysine et les résidus aromatiques)

qui entraîne un décalage du maximum d'absorption de ce colorant de 465 nm vers 595 nm. L'absorbance lue à 595 nm est alors proportionnelle à la concentration de protéines. Cette technique à l'avantage de subir moins d'interférences avec des détergents et offre une sensibilité environ 4 fois supérieure que celle de Lowry (Bradford, 1976 ; Lowry *et al.*, 1951). Le domaine de linéarité de cette méthode se situe entre 1 et 25 µg/ml de protéines en microplaque.

Une gamme d'étalonnage est réalisée en triplicata à partir d'une solution standard de BSA à 100 µg/ml. Des dilutions sont effectuées en PBS dans un volume final de 200 µl afin d'obtenir la gamme de concentration suivante : 1; 2,5; 5; 10; 15; 20; et 25 µg/ml.

La quantité de protéine dans chaque échantillon est déterminée avec trois dilutions qui diffèrent en fonction du type d'échantillon. Les échantillons provenant d'une lyse des cellules, ceux-ci sont en milieu fortement acide avec l'HClO₄ 0,2N. Une augmentation du pH des 20 µl d'échantillon est réalisée avec 2 µl de tampon acétate 2M pH 4,8 puis des dilutions au 1/40, 1/100 et 1/200 sont effectuées.

Le dosage, réalisé en triplicata pour chaque dilution, est effectué sur 200 µl auxquels 50 µl de réactif de Bradford sont ajoutés. Après agitation par aspirations/refoulements, les microplaques sont lues à 620nm (lecteur de microplaques Packard Fusion α).

VI - L'analyse par HPLC-ECD

VI.A - L'appareillage

Le système HPLC est un appareil Beckman Coulter System System Gold 118, série n°4521315. Il est couplé à une colonne HICROM Ltd, type Zorbax ODS, série n°H6460, 15cm de longueur et 4,6cm de diamètre. Il s'agit d'une colonne greffée en C18. La détection électrochimique est réalisée par un ANTEC LEYDEN Intro, utilisé en mode voltamétrique à 0,6V. Un four CLUZO INFO LAB Croco-Cil, série n°2514, permet de maintenir la colonne à une température constante.

VI.B - Les méthodes utilisées

Deux méthodes ont été utilisées pour réaliser les analyses. La première, basée sur le protocole mis au point par Mefford, sépare les indolamines en phase inverse et les catécholamines en appariement d'ions (Mefford, 1981). La seconde méthode, mise au point au laboratoire pour répondre à la problématique de la thèse, consiste à analyser les catécholamines et les indolamines en même temps par appariement d'ions.

VI.B.1 - La méthode de Mefford

La phase mobile utilisée pour la séparation des indolamines est constituée d'acétate de sodium (95mM), d'acide acétique (100mM) et de 8% de méthanol. La phase mobile pour la séparation des catécholamines est quant à elle composée d'acétate de sodium (95mM), d'acide acétique (20mM), d'EDTA (0,15mM) et de 8% de méthanol. De l'octylsulfate de sodium est

ajouté à une concentration de 0,43mM (soit 0,01%) pour permettre l'appariement d'ions. Les phases sont filtrées à 0,45µm et dégazée pendant 30 minutes afin d'optimiser les analyses.

Les différents composés (DA, NA, A et DOPAC pour les catécholamines et 5-HTP, 5-HT et 5-HIAA pour les indolamines) sont dilués à 800µg/ml en HClO₄ 0,2N, à l'exception du tryptophane dilué quant à lui à 8mg/ml. Les neurotransmetteurs d'une même famille, soit catécholamines, soit indolamines, sont mélangés entre eux à raison de 250µl chacun puis une dilution au 1/1000 est réalisée afin que chaque composé soit à une concentration finale de 200ng/ml (tryptophane à 2µg/ml). Des gammes de dilutions sont ensuite réalisées (tableau 29).

Tableau 29 : Réalisation de la gamme étalon pour la méthode de Mefford

Concentrations finales, en ng/ml	40	80	120	160	200
Solution à 200ng/ml, en µl	10	20	30	40	50
HClO ₄ 0,2N, en µl	40	30	20	10	0

Un volume de 20µl est injecté pour chaque analyse d'échantillon ou point de la gamme étalon. La séparation est réalisée avec un débit constant de 0,8ml/min à une température de 20°C.

VI.B.2 - L'analyse des composés avec une seule injection

La méthode utilise l'appariement d'ions et la phase mobile, proche de celle permettant la séparation des catécholamines par la méthode de Mefford, est composée d'acétate de sodium (100mM), d'acide acétique (20mM), d'EDTA (0,18mM), d'octylsulfate de sodium (0,4mM) et de méthanol (8%), avec un pH de 4,8. Pour réaliser le standard d'HPLC, les composés, dont la liste est donnée en tableau 30, sont dissouts à 5mg/ml en HClO₄ 0,2N puis dilués à 50µg/ml avec cette même solution. La concentration finale de chaque composé varie dans le standard (tableau 30).

Tableau 30 : Composés analysés avec leurs concentrations finales dans le standard

Abréviation	Nom complet	Concentration finale (ng/ml)	Volume pour 1ml de standard, en µl
A	adrénaline	500	10
DA	dopamine	500	10
DOPAC	acide 3,4-dihydroxyphénylacétique	500	10
HVA	acide homovanillique	500	10
MA	métadrénaline	500	10
MHPG	3-méthoxy-4-hydroxyphényléthylèneglycol	5000	100
NA	noradrénaline	500	10
NMA	normétadrénaline	500	10
Tyr	tyrosine	5000	100
5-HIAA	acide 5-hydroxyindolacétique	500	10
5-HT	sérotinine	500	10
5-HTP	5-hydroxytryptophane	500	10
Trp	tryptophane	2000	40

Les composés sont ensuite mélangés suivant les volumes indiqués dans le tableau 30 et 660 μ l d'HClO₄ 0,2N sont ajoutés. Le standard est injecté après avoir été dilué au 1/10 ou au 1/40. Le volume d'injection pour les échantillons et les dilutions de standard est de 100 μ l. Le débit de la phase mobile varie en fonction du temps (figure 70) mais l'analyse est réalisée à une température constante de 25°C.

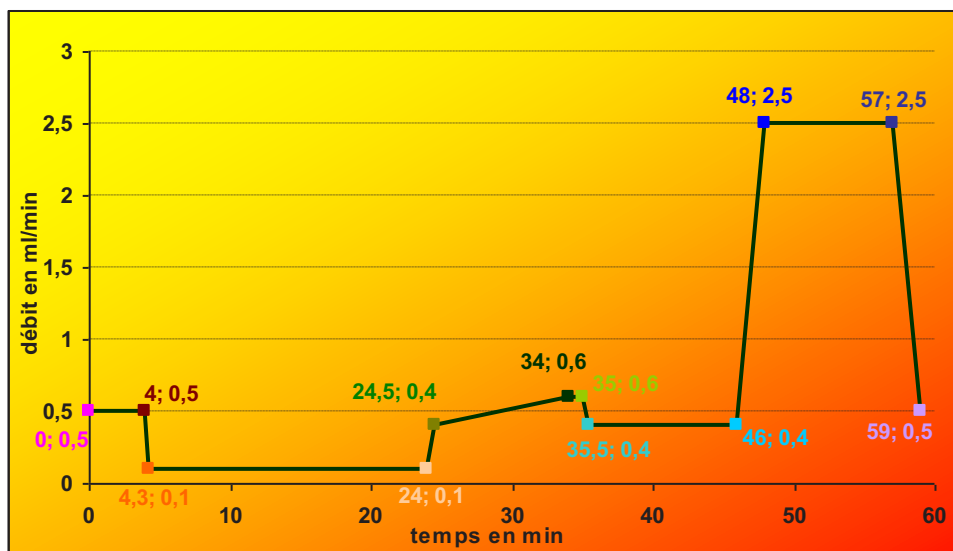


Figure 70 : Débits utilisés pour la séparation par HPLC
Pour chaque point, la première valeur correspond au temps et la seconde au débit

VII - Acquisition des données et traitement des résultats

Les chromatogrammes sont enregistrés et traités avec le logiciel Azur 5.0.10.0 de DATALYS. La quantité molaire de chaque composé est déterminée et pondérée par la masse de protéines pour chaque échantillon. Les cinétiques enregistrées après injection de MSO ont été analysées par le test MANOVA (analyse de la variance multivariée) grâce au logiciel Statview alors que les résultats à un temps précis ont été analysés avec un test de Student (test *t*).

Les valeurs présentées correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM) pour le nombre d'animaux testés. Les valeurs sont considérées comme significativement différentes avec un pourcentage d'erreur inférieur à 5% pour $p < 0,05$, inférieur à 1% pour $p < 0,01$ ou inférieur à 0,1% pour $p < 0,001$.

Résultats et discussion

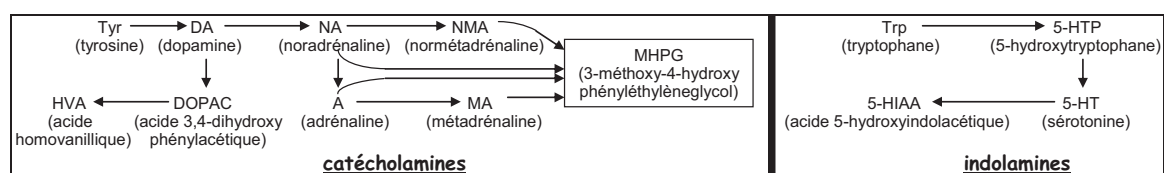
L'évolution des neurotransmetteurs monoaminés après injection de MSO a été analysée pour les souris G6. Afin de mieux comprendre l'implication et les variations des quatre voies de neurotransmission étudiées, il a été décidé de déterminer la variation de précurseurs et de produits de dégradations supplémentaires pour les souris consanguines. Une amélioration de la méthode a donc été nécessaire afin d'atteindre cet objectif.

I - Les neurotransmetteurs monoaminés pour les souris G6

Le Trp, le 5-HTP, la 5-HT et le 5-HIAA pour les indolamines (figure 71) et la DA, la NA, l'A et le DOPAC (figure 72) pour les catécholamines sont quantifiés pour les souris MSO-Slow G6 et MSO-Fast G6 avec ou sans injection de MSO.

Les quantités d'indolamines mesurées diffèrent en fonction de la lignée (figure 71). Les MSO-Fast possèdent un taux plus élevé de 5-HT que les MSO-Slow. Cette différence est due au métabolisme des MSO-Slow qui conduit à une plus faible accumulation de 5-HT. En effet, la quantité en 5-HIAA est plus forte chez les MSO-Slow.

L'étude des indolamines révèle également que la quantité de Trp ne varie pas après injection de MSO ni pour les MSO-Fast, ni pour les MSO-Slow (figure 71). La MSO induit une augmentation de la quantité de 5-HT chez les MSO-Fast uniquement. À l'inverse, chez les MSO-Slow, se sont le précurseur 5-HTP et le produit de dégradation 5-HIAA qui augmentent sous injection de MSO. Une activation des neurones sérotoninergiques serait donc induite par la MSO aussi bien chez les MSO-Fast que chez les MSO-Slow. Les différences observées entre les deux lignées après injection de sérum physiologique sont ainsi amplifiées par l'injection de MSO.



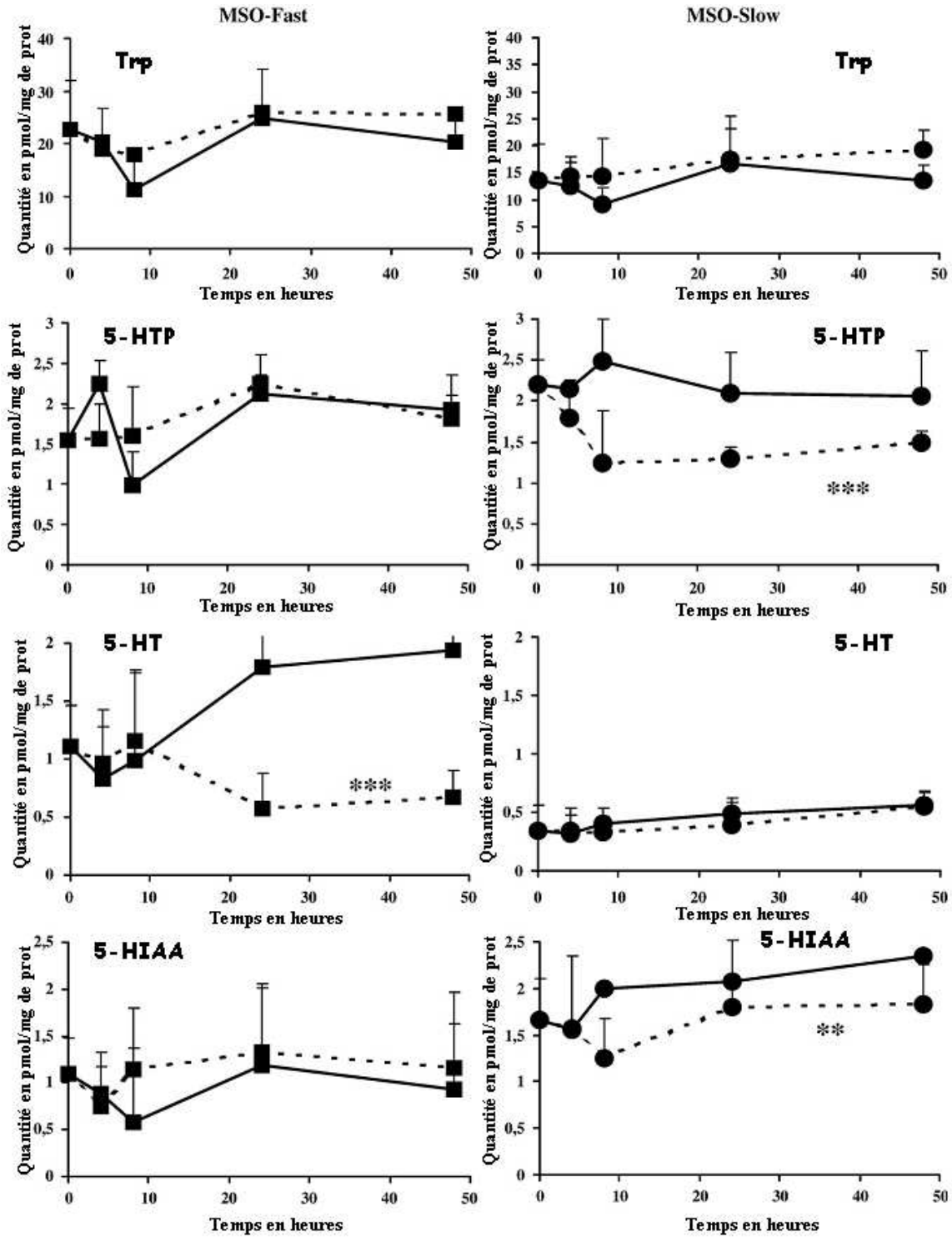
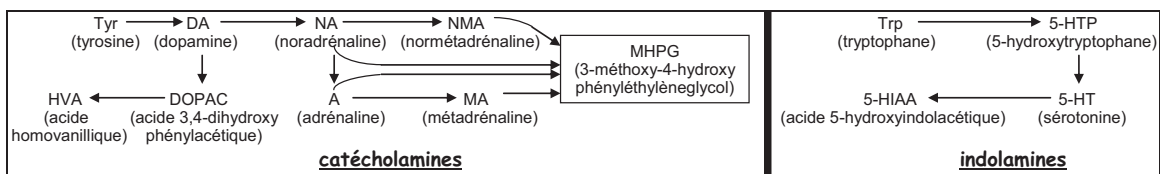


Figure 71 : Variation des quantités d'indolamines pour les souris G6
Moyenne + SEM, n=10. Trait plein : injection de MSO 75mg/kg, trait pointillés : injection de sérum physiologique.



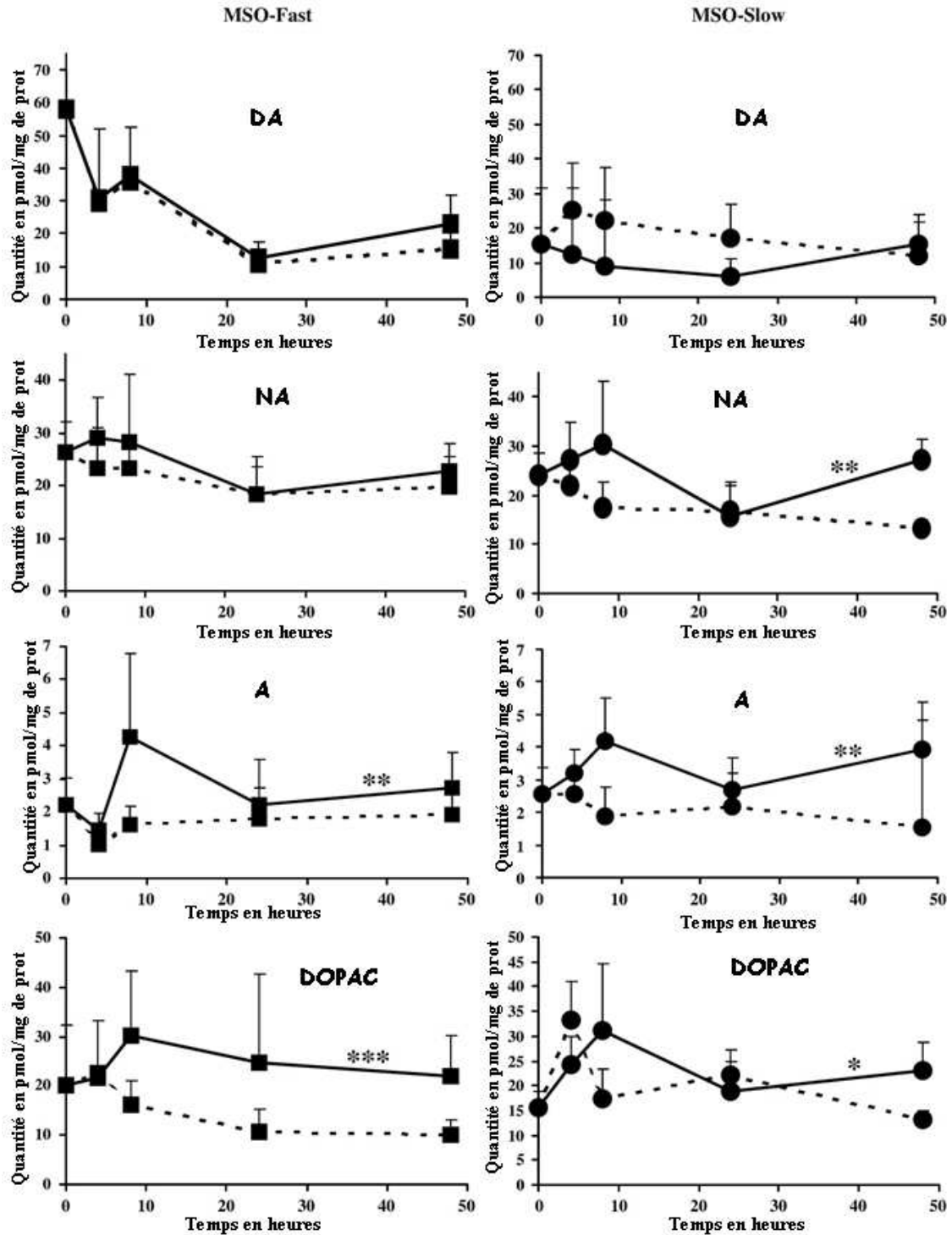
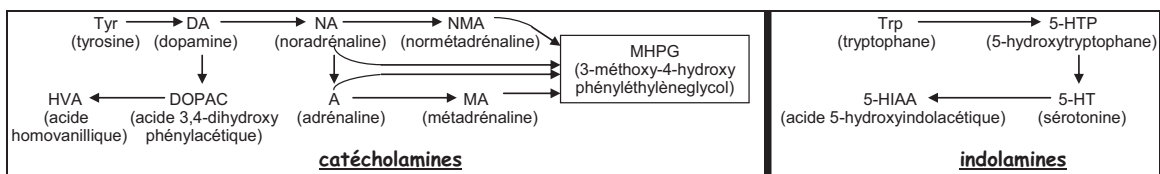


Figure 72 : Variation des quantités de catécholamines pour les souris G6
Moyenne + SEM, n=10. Trait plein : injection de MSO 75mg/kg, trait pointillés : injection de sérum physiologique.

Seuls la DA et le DOPAC ont des quantités différentes entre les deux lignées après injection de sérum physiologique (figure 72). La DA est en quantité plus importante chez les MSO-Fast alors que les MSO-Slow ont une quantité plus importante de DOPAC que les



MSO-Fast. Les MSO-Slow utilisent donc plus la DA alors que les MSO-Fast accumulent ce neurotransmetteur.

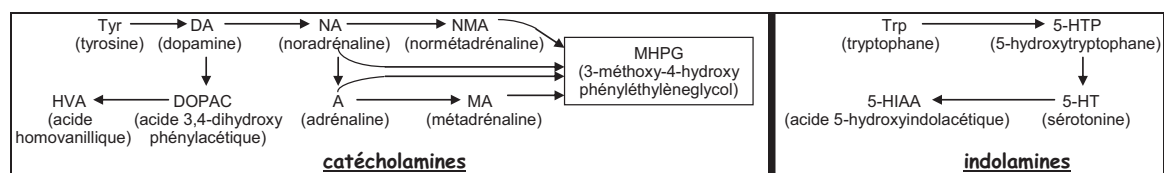
L'injection de MSO conduit à une augmentation significative des quantités de neurotransmetteurs A et NA, sauf pour le taux de NA des MSO-Fast pour lequel la différence n'est pas significative (figure 72). Ces augmentations étant similaires chez les MSO-Slow et les MSO-Fast, il est fort probable que ces deux neurotransmetteurs n'interviennent pas dans le mécanisme de sensibilité ou de résistance à la MSO. La quantité de DOPAC est également augmentée par la MSO mais cette augmentation est différente en fonction de la lignée. Celle-ci est plus importante chez les MSO-Fast, suggérant une plus forte activation de la neurotransmission dopaminergique que chez les MSO-Slow.

II - Étude des monoamines sur les lignées consanguines

II.A - La voie dopaminergique

La concentration de DA est mesurée pour les lignées MSO-Slow et MSO-Fast consanguines. Cette mesure est complétée par l'analyse de deux produits de dégradation, le DOPAC et l'HVA (figure 73). Les trois composés de la voie dopaminergique mesurés ont des quantités identiques entre les mâles et les femelles après injection de sérum physiologique, quelle que soit la lignée consanguine.

Aucune différence n'est observée pour la voie dopaminergique chez les MSO-Slow après injection de MSO à 75mg/kg, contrairement aux MSO-Fast. Pour cette lignée, l'effet de la MSO se traduit par une augmentation de la quantité de DOPAC chez les mâles ($p=0,0185$) et une augmentation de la quantité d'HVA chez les mâles ($p=0,0004$) et les femelles ($p=0,0166$). La DA a une cinétique identique chez les mâles et les femelles MSO-Fast après injection de MSO ($p=0,9168$). Les concentrations mesurées sont en revanche supérieures pour les mâles ($p=0,0469$) après injection de MSO alors qu'elles ne pouvaient pas être considérées comme différentes entre les mâles et les femelles après injection de sérum physiologique ($p=0,2311$).



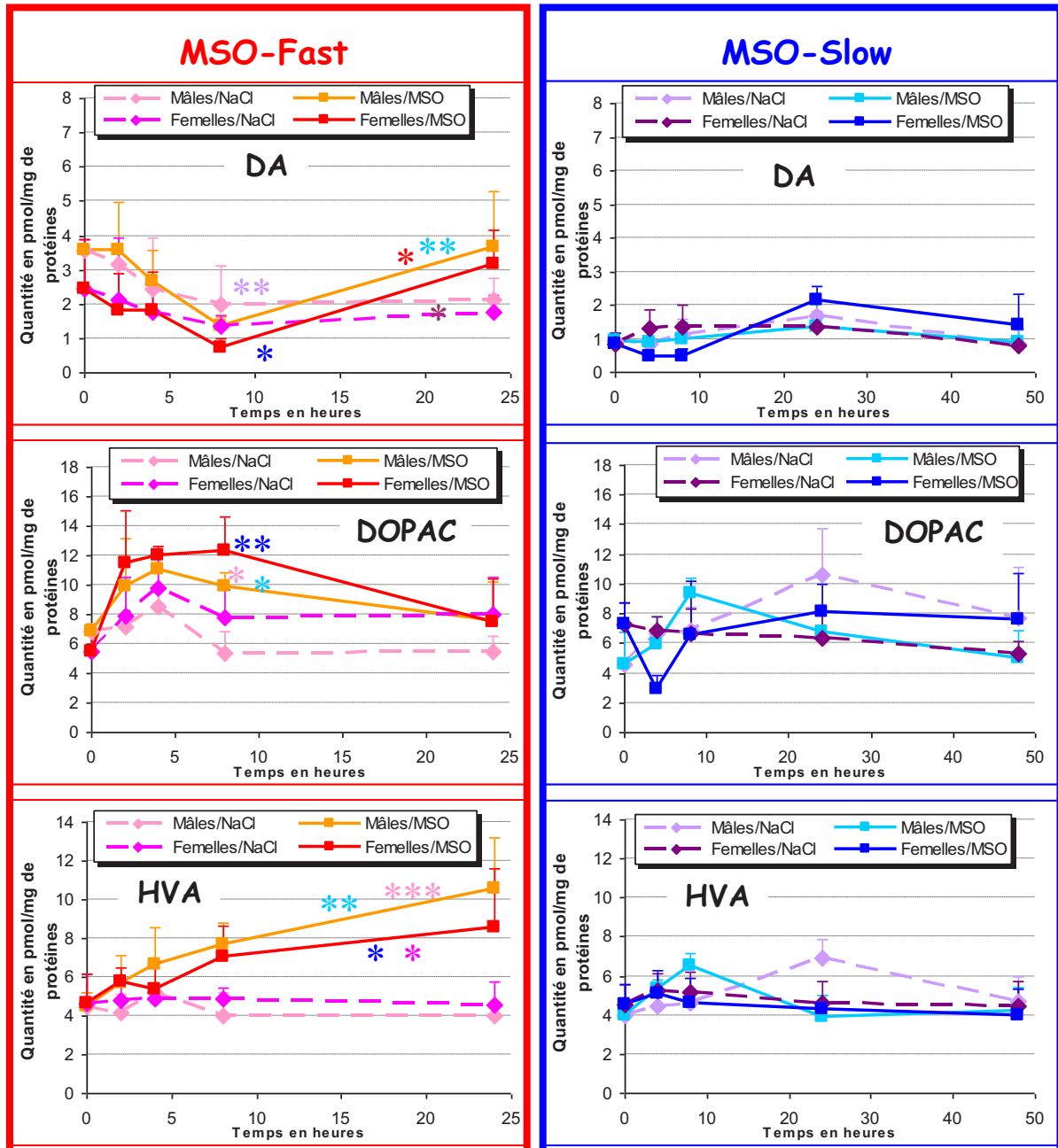
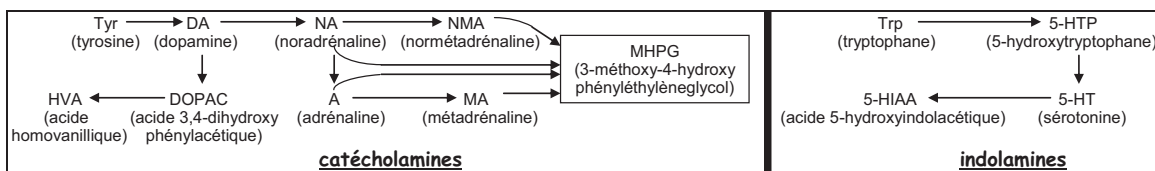


Figure 73 : Composés de la voie dopaminergique chez les lignées consanguines après injection de MSO à 75mg/kg ou de sérum physiologique (NaCl). Moyenne ± SEM pour n=3-4. Analyse par le test MANOVA, * : $p < 0,05$, *** : $p < 0,001$. La couleur des astérisques indique la courbe à laquelle se rapporte la significativité.



II.B - Les voies adrénargique et noradrénargique

L'A et son produit de dégradation la MA ont été mesurés (figure 74). L'A est synthétisée à partir d'un autre neurotransmetteur, la NA, lui-même synthétisé à partir de la DA. La NA, la NMA (produit de dégradation de la NA principalement astrocytaire) et le MHPG, produit de dégradation commun à la NA et à l'A, sont également mesurés (figure 75).

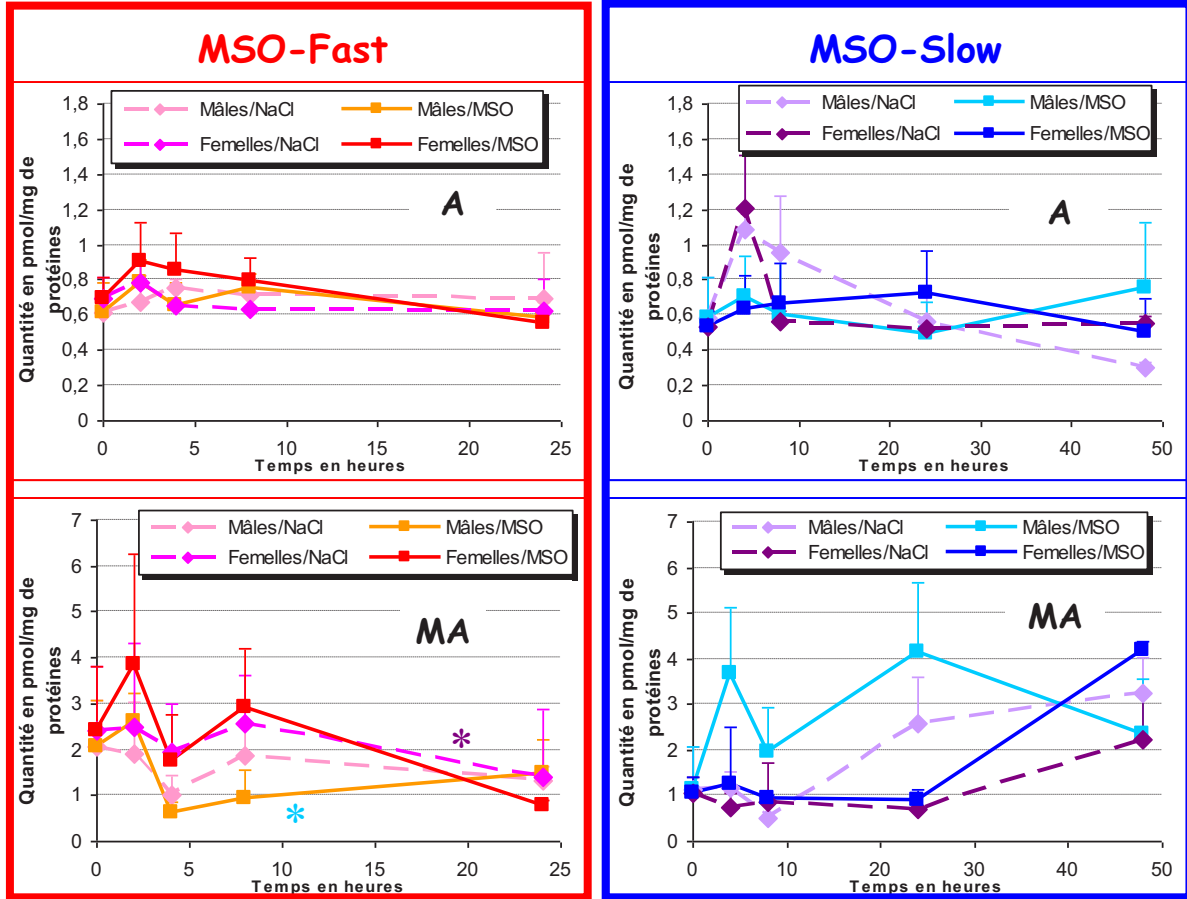
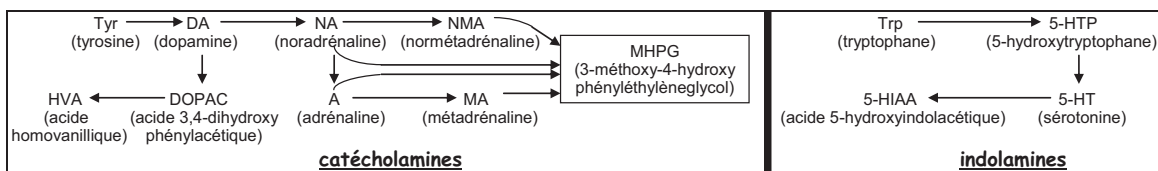


Figure 74 : Composés de la voie adrénargique chez les lignées consanguines après injection de MSO à 75mg/kg ou de sérum physiologique (NaCl). Moyenne \pm SEM pour $n=3-4$. Analyse par le test MANOVA.

Le taux d'A n'est pas différent entre les mâles et les femelles à l'intérieur de chaque lignée, entre les injections de MSO à 75mg/kg et de sérum physiologique et entre les deux lignées (figure 74). Il existe en revanche deux différences entre les lignées dans les concentrations de MA. Les femelles MSO-Slow possèdent un taux de MA plus faible que les femelles MSO-Fast après injection de sérum physiologique ($p=0,0212$). Les mâles MSO-Slow ont quant à eux un taux de MA plus élevé que les mâles MSO-Fast après injection de MSO ($p=0,0195$).



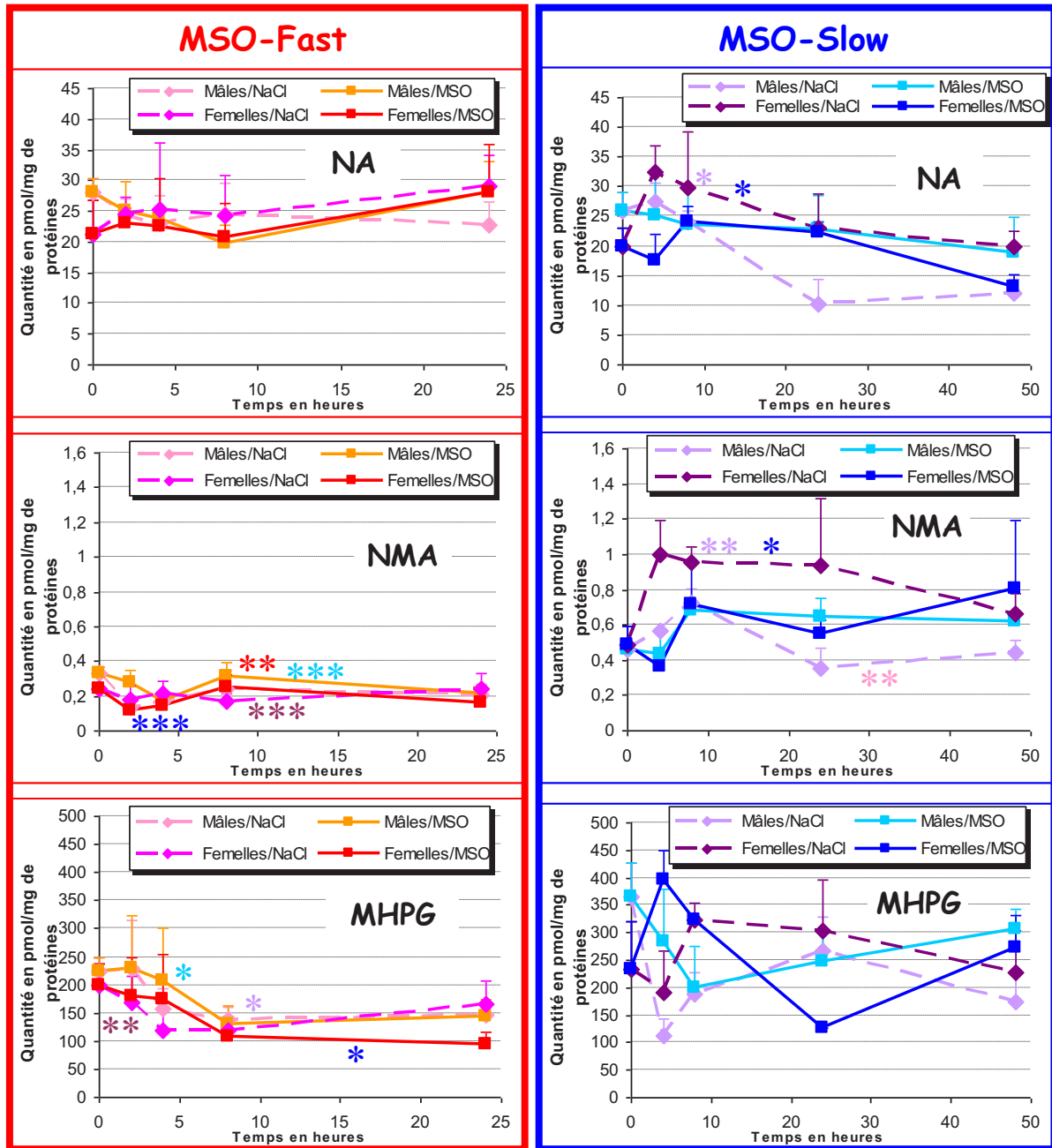
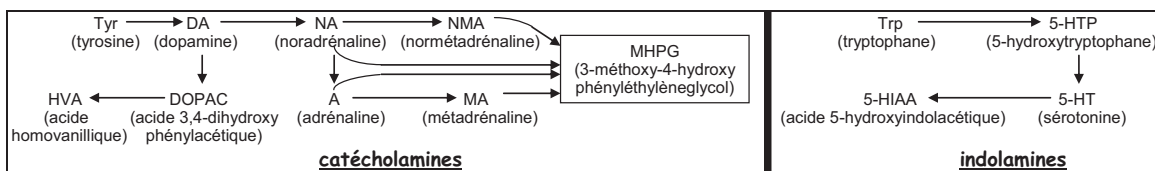


Figure 75 : Composés de la voie noradrénergique chez les lignées consanguines après injection de MSO à 75mg/kg ou de sérum physiologique (NaCl). Moyenne \pm SEM pour $n=3-4$. Analyse par le test MANOVA, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$. La couleur des astérisques indique la courbe à laquelle se rapporte la significativité.

La voie noradrénergique est la voie catécholaminergique dans laquelle il existe le plus de différences entre les groupes qui se traduisent essentiellement par des différences au niveau des deux produits de dégradation mesurés, la NMA et le MHPG et non au niveau du neurotransmetteur lui-même (figure 75). La voie adrénérgique variant peu, les variations enregistrées pour le MHPG sont donc principalement dues aux différences dans la voie noradrénergique. Seules les femelles MSO-Slow injectées avec du sérum physiologique ont un taux de NA supérieur par rapport aux mâles MSO-Slow injectés avec du sérum



physiologique ($p=0,0327$) et par rapport aux femelles injectées avec de la MSO à 75mg/kg ($p=0,0128$).

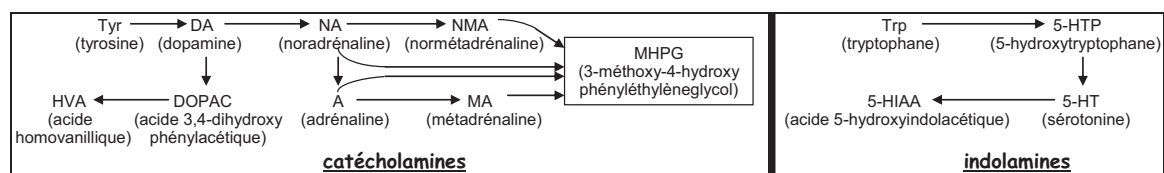
Les femelles MSO-Slow injectées avec du sérum physiologique ont un taux de NMA supérieur à celui des mâles MSO-Slow ($p=0,0012$) alors que les femelles MSO-Fast injectées avec de la MSO ont un taux de NMA inférieur à celui des mâles ($p=0,0034$). La MSO induit une diminution du taux de NMA chez les femelles MSO-Slow ($p=0,0203$) mais pas chez les mâles ($p=0,1394$). Quel que soit le sexe ou le traitement (sérum physiologique ou MSO), les souris MSO-Slow ont toujours un taux de NMA plus élevé que les souris MSO-Fast ($p<0,0001$ quelles que soient les conditions). Le taux de MHPG est également plus élevé chez les MSO-Slow :

- mâles injectés avec du sérum physiologique : $p=0,0269$
- mâles injectés avec de la MSO : $p=0,0119$
- femelles injectées avec du sérum physiologique : $p=0,0012$
- femelles injectées avec de la MSO : $p=0,0305$.

II.C - La voie sérotoninergique

Les variations des quantités de 5-HT, de son précurseur le 5-HTP et de son produit de dégradation le 5-HIAA sont donnés en figure 76.

La quantité de précurseur, le 5-HTP n'est pas différente en fonction du sexe, du traitement ou de la lignée. Les femelles MSO-Fast injectées avec du sérum physiologique ont un taux de 5-HT plus important que les mâles ($p=0,0276$). Les femelles MSO-Slow injectées possèdent quant à elles un taux de 5-HIAA plus important que les mâles ($p=0,0141$). La MSO n'induit en revanche aucune modification significative des quantités de neurotransmetteur ou de produit de dégradation, même sur la 5-HT pour les MSO-Slow ($p=0,2701$ pour les mâles et $p=0,0907$ pour les femelles).



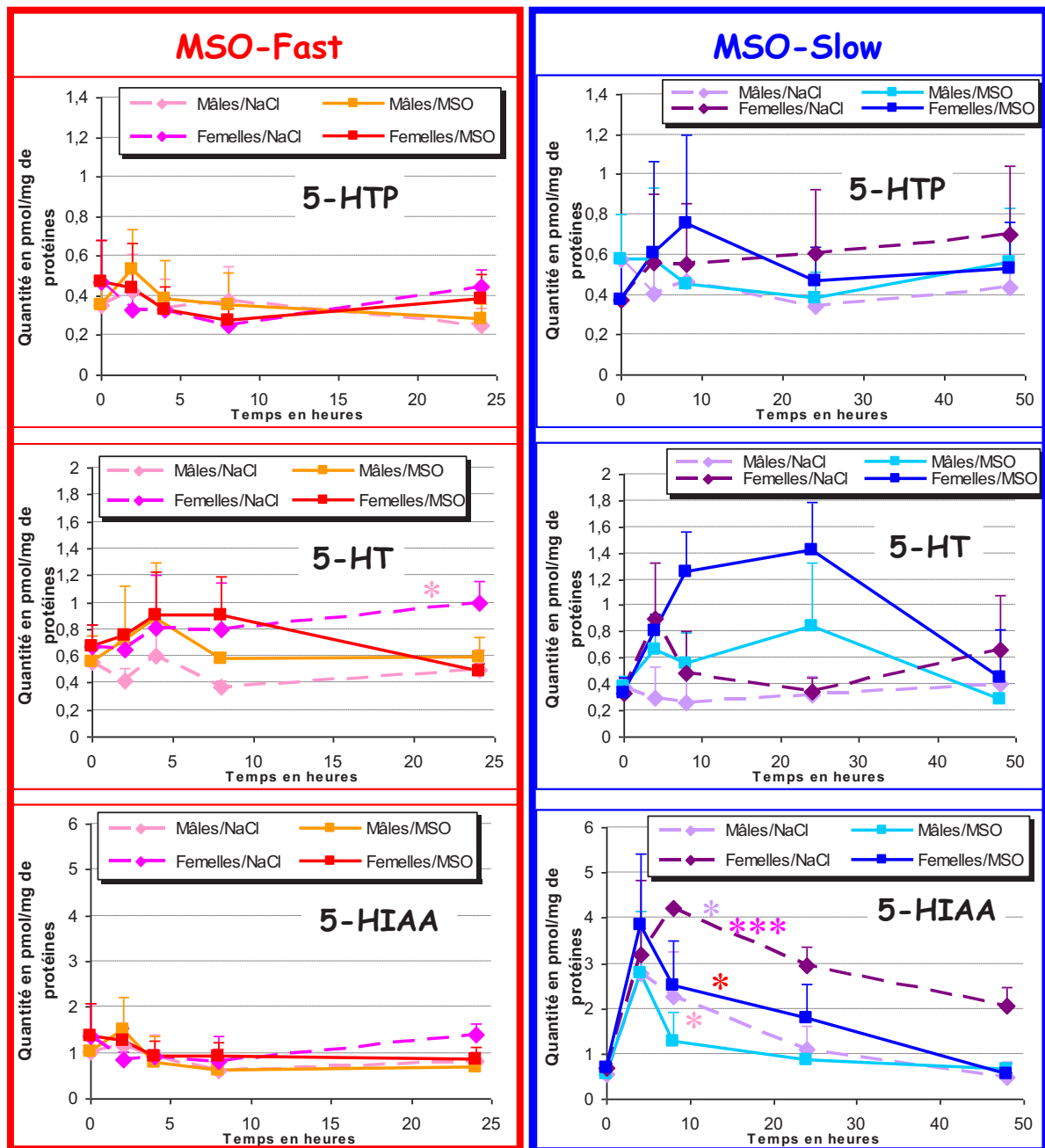
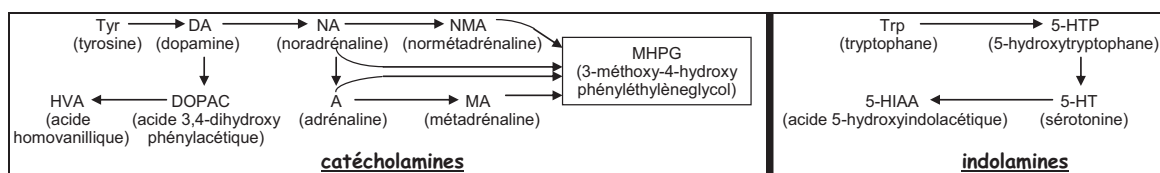


Figure 76 : Composés de la voie sérotoninergique chez les lignées consanguines après injection de MSO à 75mg/kg ou de sérum physiologique (NaCl). Moyenne \pm SEM pour $n=3-4$. Analyse par le test MANOVA, * : $p < 0,05$. La couleur des astérisques indique la courbe à laquelle se rapporte la significativité.

La différence entre les deux lignées concerne le taux plus élevé de 5-HIAA chez les souris MSO-Slow :

- mâles injectés avec du sérum physiologique : $p=0,0166$
- femelles injectées avec du sérum physiologique : $p=0,0003$
- femelles injectées avec de la MSO : $p=0,0161$.

La différence entre les mâles injectés avec de la MSO ne peut en revanche pas être considérée comme significative ($p=0,0737$).



III.D - Les acides aminés précurseurs

La variation de la quantité des deux acides aminés précurseurs, la Tyr et le Trp, a été mesurée (figure 77). Seules les MSO-Slow possèdent une différence mâles/femelles, uniquement pour le Trp après injection de sérum physiologique (p=0,0001) ou de MSO (p<0,0001).

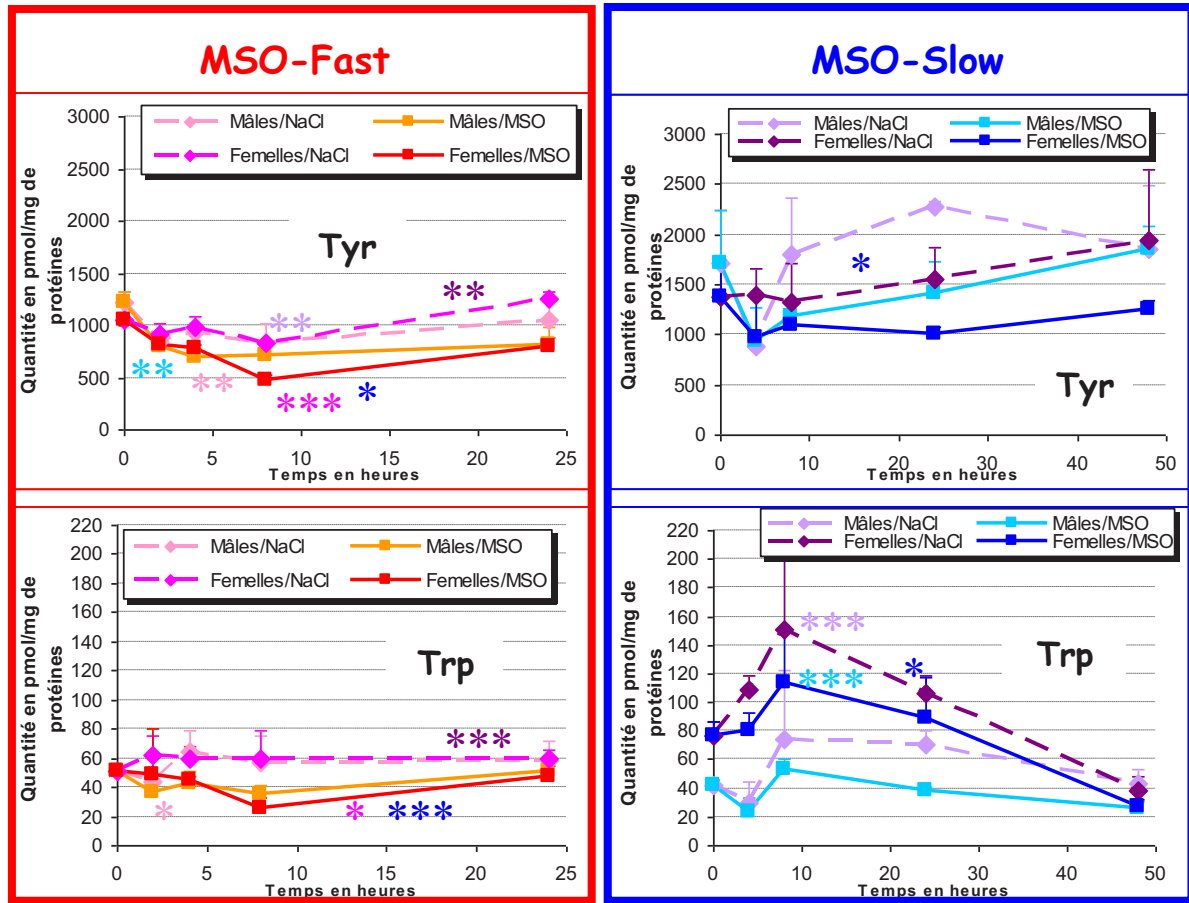


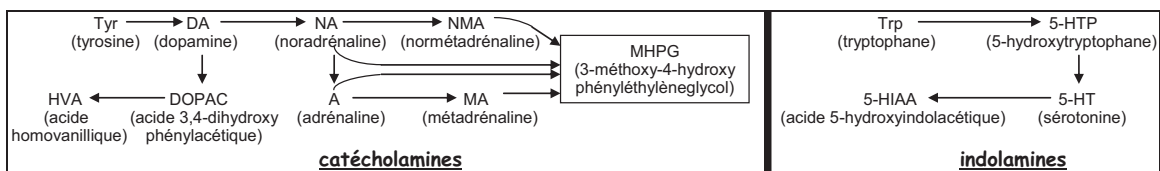
Figure 77 : Acides aminés précurseurs chez les lignées consanguines après injection de MSO à 75mg/kg ou de sérum physiologique (NaCl). Moyenne \pm SEM pour n=3-4. Analyse par le test MANOVA, * : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0,001. La couleur des astérisques indique la courbe à laquelle se rapporte la significativité.

La MSO induit une diminution significative de la quantité de Tyr libre pour les MSO-Fast et les femelles MSO-Slow :

- mâles MSO-Fast : p=0,0033
- femelles MSO-Fast : p<0,0001
- femelles MSO-Slow : p=0,0247.

Cette diminution est également observée pour le Trp :

- mâles MSO-Fast : p=0,0137
- femelles MSO-Fast : p=0,0169
- femelles MSO-Slow : p=0,0201.



La diminution de la quantité des acides aminés précurseurs des neurotransmetteurs monoaminés n'est pas en revanche significative pour les mâles MSO-Slow ($p=0,1872$ pour la Tyr et $p=0,0652$ pour le Trp).

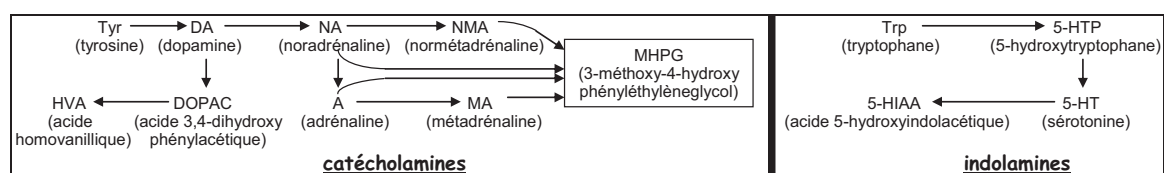
Les MSO-Slow possèdent en outre des quantités supérieures de Tyr et de Trp par rapport aux MSO-Fast, excepté pour le taux de Trp chez les mâles MSO-Slow qui n'est pas significativement différent de celui des MSO-Fast ($p=0,0947$ après injection de sérum physiologique et $p=0,1008$ après injection de MSO).

III - Différences dans les voies de neurotransmission monoaminergiques

La voie de neurotransmission adrénergique est peu présente au niveau du cortex cérébral, ce qui peut expliquer les similarités de cette voie entre les lignées consanguines MSO-Slow et MSO-Fast, aussi bien après injection de sérum physiologique que de MSO à 75mg/kg. Les voies sérotoninergique et noradrénergique sont quant à elles les voies de neurotransmissions monoaminergiques variant le plus.

Plusieurs études ont démontré la variation des quantités d'indolamines après injection de MSO (Blizard et Balkoski, 1982 ; Hevor et Delorme, 1990 ; Picard *et al.*, 2011). Le taux de 5-HT est ainsi diminué après injection d'une dose convulsivante de MSO. Les résultats sur les lignées souris consanguines indiquent que l'injection de MSO à 75mg/kg n'induit pas de modification du taux de 5-HT, ni chez les MSO-Fast, ni chez les MSO-Slow. Il y aurait même une tendance à l'augmentation après injection de MSO chez les MSO-Slow. Cette tendance peut être mise en parallèle à celle de la diminution du taux de 5-HIAA pour les MSO-Slow. Les MSO-Fast ont en outre une voie sérotoninergique moins active que les MSO-Slow, se traduisant par un taux plus faible de 5-HIAA pour les MSO-Fast. Les MSO-Slow synthétisent donc de la 5-HT en grande quantité et un arrêt de la transmission sérotoninergique conduirait à une accumulation de 5-HT au niveau du bouton synaptique, expliquant ainsi la tendance à l'augmentation de la quantité de 5-HT chez les MSO-Slow, alors qu'une baisse du taux de 5-HT est observé dans d'autres modèles d'épilepsies, comme par exemple un modèle génétique de convulsions idiopathiques partielles complexes (Hiramatsu *et al.*, 1987) ou un modèle d'épilepsie myoclonique (Welsh *et al.*, 2002).

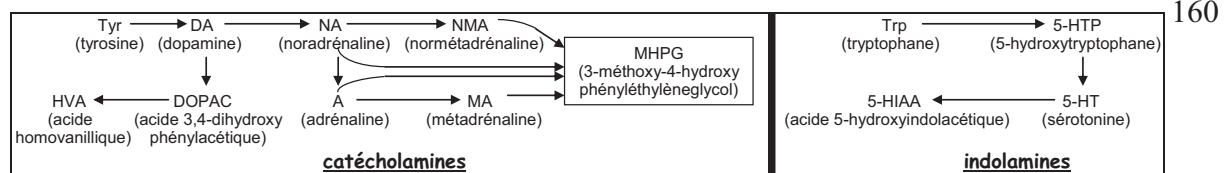
Les deux produits de dégradation de la voie noradrénergique étudiés, la NMA et le MHPG, sont en plus grande quantité chez les MSO-Slow quel que soit le sexe ou le traitement. La MSO n'induit un changement de la voie noradrénergique que chez les femelles MSO-Slow, se traduisant par une diminution des quantités de NA et de NMA. Les variations de la neurotransmission noradrénergique sont astrocytaires car l'enzyme transformant la NA en NMA, la COMT, n'est pas présente dans les neurones (Eisenhofer *et al.*, 2004). Il a été démontré que la neurotransmission noradrénergique joue également un rôle protecteur contre l'apparition des crises épileptiques induites par certains stimuli physiques ou chimiques, comme les stimuli auditifs ou le PTZ (Corcoran *et al.*, 1974 ; Jerlicz *et al.*, 1978). Le taux de NA plus élevé chez les MSO-Slow que chez les MSO-Fast pourrait ainsi expliquer la différence de sensibilité à la MSO entre les deux lignées.



Une variation des composés de la voie dopaminergique étudiés a été enregistrée. Les MSO-Slow possèdent des taux de DA plus faibles que les MSO-Fast après injection de sérum physiologique. L'injection de MSO à 75mg/kg induit une augmentation des produits de dégradation chez les MSO-Fast (DOPAC et HVA pour les mâles, HVA pour les femelles). Les taux de produits de dégradations deviennent alors plus faibles chez les MSO-Slow injectés à la MSO par rapport aux MSO-Fast. Plusieurs études ont montré une modification de la voie dopaminergique après injection de MSO. Les études réalisées avec une injection intra-péritonéale de MSO ont mis en évidence une diminution de la quantité de DA (Hevor *et al.*, 1990 ; Samuels *et al.*, 1978) ou une augmentation temporaire de DOPAC après une injection intra-cérébrale (Rothstein et Tabakoff, 1982). Les MSO-Slow auraient ainsi une prédisposition à lutter contre les crises se traduisant par un taux plus faible de DA et l'augmentation du taux de DOPAC chez les MSO-Fast après injection de MSO à 75mg/kg indiquerait que la lignée MSO-Fast est très sensible à cette dose.

Les variations de la voie dopaminergique chez les MSO-Fast pourraient s'expliquer non pas par la fonction de neurotransmission de la DA mais par sa fonction de précurseur de la NA. En effet, une suppression de la DA β -hydroxylase, enzyme produisant la NA à partir de la DA, conduit à une diminution de l'effet protecteur d'un anticonvulsivant, l'acide valproïque (Schank *et al.*, 2005). Les MSO-Fast pourraient présenter une activité réduite de cette enzyme, expliquant le taux de DA basal supérieur au taux des MSO-Slow. L'injection de MSO conduirait à un besoin en NA et de ses précurseurs pour lutter contre les crises mais les MSO-Fast seraient incapables de transformer assez de DA en NA et l'excès de DA serait alors dégradé, expliquant l'augmentation des taux de DOPAC et d'HVA pour cette lignée.

La diminution après injection de MSO des acides aminés précurseurs Tyr et Trp a été mise en évidence. Cette diminution a été observée dans de nombreuses études (Blizard et Balkoski, 1982 ; Picard *et al.*, 2011 ; Samuels *et al.*, 1978). Cependant, l'utilisation de ces acides aminés pour la neurotransmission ne peut expliquer à elle seule leur diminution. La MSO conduit à la néo-synthèse de nombreuses protéines, soit parce qu'elle inhibe de manière irréversible sa cible, comme la GS (Ronzio *et al.*, 1969), soit parce qu'elle conduit indirectement à un besoin, comme pour la protéine chaperonne HSP-27 (Bidmon *et al.*, 2008) ou la FBPase (Hevor *et al.*, 1986). De plus, l'injection de MSO induit des crises chez les animaux qui rendent difficile le déplacement pour se nourrir. Le Trp est un acide aminé essentiel pour la souris et la Tyr est synthétisée à partir d'un autre acide aminé essentiel, la Phe. Les deux phénomènes conjugués, à savoir la néo-synthèse protéique et l'absence d'alimentation, peuvent expliquer la baisse en quantité de ces deux acides aminés.



DISCUSSION GÉNÉRALE

Les parties expérimentales ont mis en évidence que les lignées consanguines MSO-Slow et MSO-Fast sont différentes l'une de l'autre. Les étapes supplémentaires de sélection par la latence des convulsions généralisées après injection de MSO ainsi que les croisements consanguins ont permis de fixer le caractère de sensibilité à la MSO pour les MSO-Fast, avec une latence de 277 ± 64 minutes pour une dose de MSO de 75mg/kg. Les MSO-Slow consanguines sont quant à elles plus résistantes que les souris de la génération G6 puisque le taux maximal de convulsion, soit 30%, est observé pour une dose de 350mg/kg, avec une latence moyenne de 477 ± 172 minutes.

La dose de 350mg/kg entraîne chez les MSO-Slow une cinétique d'apparition des différents stades de crises épileptiques (selon l'échelle de Racine (Racine, 1972)) similaire à celle observée chez les MSO-Fast, avec cependant des temps de latence légèrement plus élevés pour les MSO-Slow. La principale différence entre les MSO-Fast et les MSO-Slow concerne le dernier stade, correspondant aux convulsions généralisées, qui est absent chez la plupart des souris MSO-Slow. Cette différence est également visible au niveau des EEG des MSO-Slow pour lesquelles les anomalies enregistrées sont brèves et de faible intensité.

Seule l'injection d'un convulsivant spécifique de la voie de signalisation glutamatergique, le KA, a induit une différence de réponse entre les deux lignées consanguines, les MSO-Fast convulsant plus rapidement. À l'inverse, l'injection de convulsivants spécifiques des voies GABAergique ou cholinergique induisait une réponse identique entre les deux lignées. Ces résultats sont renforcés par l'injection d'anticonvulsivants puis de MSO. La MSO et l'anticonvulsivant spécifique de la voie glutamatergique, le MK-801, ont des effets antagonistes chez les MSO-Slow. Les latences aux convulsions généralisées provoquées par la MSO chez les souris MSO-Fast sont augmentées par l'injection de MK-801 mais la MSO n'antagonise pas les effets du MK-801 pour cette lignée. Seules les deux molécules agissant sur la voie glutamatergique induisent des effets différents entre les lignées MSO-Fast et MSO-Slow, contrairement aux deux molécules agissant sur la voie GABAergique.

La pression de sélection induite par l'injection de MSO a donc permis d'obtenir deux lignées, MSO-Fast et MSO-Slow, ayant des réponses différentes à la MSO médiées par la voie glutamatergique. Bien que l'action de la MSO sur la voie glutamatergique a parfois été discutée en raison notamment de la diminution du taux de glutamate pendant les crises (Fonnum et Paulsen, 1990 ; Somers et Beckstead, 1990), cette voie est celle admise aujourd'hui comme mécanisme d'action de la MSO, l'une des principales cibles étant la GS (Eid *et al.*, 2008 ; Lamar et Sellinger, 1965 ; Ronzio *et al.*, 1969 ; Zou *et al.*, 2010). Il existe d'autres enzymes dont les activités sont modifiées par la MSO. Cependant, ces enzymes, qui sont l'alanine aminotransférase, la glutamine transaminase et la glutamate déshydrogénase (Dadsetan *et al.*, 2011 ; Lamar et Sellinger, 1965 ; Makar *et al.*, 1994), interviennent également dans la voie GABAergique. Les deux lignées de souris différeraient donc plus au niveau de la GS qu'au niveau des trois autres enzymes.

L'étude des activités des GS extraites des cortex cérébraux des deux lignées nous indique que les astrocytes des MSO-Slow possèdent une plus grande quantité de GS que les astrocytes des MSO-Fast. En revanche, la GS des MSO-Fast a une plus forte affinité pour le glutamate que celle des MSO-Slow. La MSO, quant à elle, inhibe de la même manière la GS des MSO-Slow et celle des MSO-Fast. Les souris MSO-Slow possédant une plus grande quantité de GS active, il faudrait donc une dose supérieure de MSO aux MSO-Slow pour qu'elles subissent une perturbation identique de la voie glutamatergique à celle des MSO-Fast.

L'inhibition de la GS par la MSO entraîne une diminution du recyclage du glutamate par cette voie ainsi qu'une accumulation de la concentration en ammoniacque. Cette accumulation n'est cependant pas à l'origine des crises puisque le taux maximal d'ammoniacque précède les crises de 4 à 7 heures avant les premières convulsions généralisées sur des rats Wistar injectés à 100mg/kg de MSO (Bidmon *et al.*, 2008). Il est donc plus probable que les convulsions généralisées aient pour origine la diminution de la conversion du glutamate en glutamine. Cette diminution a été mise en évidence dans des modèles mimant l'épilepsie du lobe temporal (Alvestad *et al.*, 2011 ; Cavus *et al.*, 2005) mais également chez des patients épileptiques (Eid *et al.*, 2004). La concentration extracellulaire en glutamate est alors augmentée (Cavus *et al.*, 2005 ; Eid *et al.*, 2004) mais une mort cellulaire importante est enregistrée en parallèle. La MSO provoque quant à elle une diminution du glutamate extracellulaire (Fonnum et Paulsen, 1990 ; Somers et Beckstead, 1990). La modification de la concentration en glutamate extracellulaire ne peut donc expliquer les convulsions, qui arrivent tardivement par rapport à l'injection de MSO.

Il est démontré que la régulation du taux de glutamine influe sur la récurrence des crises de type glutamatergique (Sandow *et al.*, 2009 ; Tani *et al.*, 2010). La MSO inhibant de la GS en se fixant de manière irréversible sur cette enzyme, les souris doivent donc synthétiser de nouvelles protéines pour rétablir le cycle glutamate-glutamine. Une quantité anormalement élevée de glutamine pourrait alors être produite et induire des convulsions généralisées. Les temps de latence observés après injection de MSO seraient donc en partie dépendants de l'accumulation de glutamine et du dérèglement du cycle glutamate-glutamine.

La différence d'activité entre les GS des souris MSO-Fast et MSO-Slow peut alors expliquer en partie la différence de réponses aux injections de KA. L'injection de ce convulsivant a pour effet d'augmenter la quantité de glutamate à recycler en se fixant sur une partie des récepteurs à la place du neurotransmetteur. L'excès de glutamate créé pourrait alors être régulé par les MSO-Slow de manière efficace et rapide, expliquant pourquoi, après injection de KA, peu de souris convulsent mais avec des temps de latence plus faibles que les souris MSO-Fast présentant elles aussi des convulsions généralisées. Les MSO-Fast quant à elles rétabliraient le cycle glutamate-glutamine plus tardivement et moins efficacement, conduisant à un fort taux de convulsion avec des latences plus élevées que les souris MSO-Slow convulsant.

La sensibilité des MSO-Fast pourrait alors être due aux caractéristiques de leur GS. La plus faible concentration de GS active par rapport aux MSO-Slow expliquerait pourquoi des doses faibles de MSO suffisent à inhiber leur GS. Les faibles temps de latence aux convulsions généralisées pourraient s'expliquer par la plus forte affinité pour le glutamate. En effet, les GS nouvellement synthétisées produiraient alors simultanément et rapidement une quantité importante de glutamine, avec pour conséquence finale des convulsions généralisées.

Quant aux souris MSO-Slow, leur plus grande quantité de GS active permettrait de compenser les effets de la MSO.

Cette hypothèse ne tient cependant pas compte du fait que l'excès de glutamate peut en partie être éliminé par une autre voie, le cycle de Krebs (Alvestad *et al.*, 2008 ; Poitry *et al.*, 2000). Un des intermédiaires de cette voie, le pyruvate, permet une connexion avec le métabolisme glucidique. Il doit donc exister au moins un facteur supplémentaire, autre que la dérégulation du cycle glutamate-glutamine et appartenant probablement au métabolisme glucidique, expliquant la grande sensibilité à la MSO des MSO-Fast et la grande résistance des MSO-Slow à des doses élevées de MSO.

Parmi les études réalisées sur les souris G6 (Cloix *et al.*, 2010a), l'augmentation de la quantité de glycogène cérébral induite par la MSO était différente entre les lignées MSO-Fast et MSO-Slow. Les résultats obtenus sur les souris consanguines montrent une variation identique du taux de glycogène après injection de MSO entre les souris MSO-Fast consanguines et les souris MSO-Fast G6. L'augmentation est en revanche plus faible pour les souris MSO-Slow consanguines par rapport aux MSO-Slow G6 après injection de MSO, aussi bien à 75mg/kg qu'à 200mg/kg. Cette diminution de la variation est observée dans les mêmes proportions pour les mâles et les femelles MSO-Slow consanguines. Ces résultats montrent que les MSO-Fast consanguines sont peu différentes des MSO-Fast G6 et que la consanguinité n'a pas modifié la réponse glycogénique à la MSO. À l'inverse, l'augmentation de la pression de sélection chez les MSO-Slow a conduit à une modification de la réponse du taux de glycogène à l'injection de MSO pour cette lignée.

L'accumulation du glycogène est cependant plus élevée chez les MSO-Fast consanguines par rapport aux MSO-Slow consanguines injectées à une dose de MSO de 75mg/kg ou de 200mg/kg. *In vitro*, l'accumulation de glycogène induite par la MSO est plus forte pour les astrocytes MSO-Slow que pour les astrocytes MSO-Fast. Les astrocytes MSO-Slow sont donc capables de synthétiser et d'accumuler du glycogène après administration de MSO. Cette hypothèse est renforcée par la cinétique des MSO-Slow injectées à 200mg/kg pour lesquelles l'accumulation de glycogène est plus importante à 4 heures qu'à 8 heures. Cependant, l'accumulation du glycogène cérébral reste plus faible chez les MSO-Slow que chez les MSO-Fast. La complexité tissulaire, et notamment les interactions entre les neurones et astrocytes pourrait expliquer la plus faible accumulation de glycogène tissulaire chez les MSO-Slow.

La FBPase, enzyme de la gluconéogenèse, a son activité augmentée après injection de MSO (Bernard-Hélary *et al.*, 2002 ; Hevor *et al.*, 1986). Cette modification de l'activité est en accord avec l'accumulation de glycogène induite par la MSO (Bernard-Hélary *et al.*, 2000 ; Cloix et Hévor, 2009 ; Folbergrová *et al.*, 1969 ; Phelps, 1975 ; Swanson *et al.*, 1989). Une des hypothèses relatives à l'épilepsie consiste à définir la capacité à accumuler le glycogène comme un facteur de résistance aux convulsions généralisées. Les souris MSO-Slow consanguines, à une dose de 200mg/kg, n'accumulent que temporairement le glycogène sans pour autant avoir des convulsions généralisées (10% de la population convulsant en moins de 10 heures après l'injection de MSO). De plus, l'accumulation maximale de glycogène (4 heures après l'injection de MSO) est antérieure d'au moins 6 heures aux convulsions généralisées. La MSO induirait donc chez les MSO-Slow une biosynthèse importante de

glycogène puis une dégradation de celui-ci qui ne serait pas contrôlée par les astrocytes, expliquant la très forte accumulation *in vitro* dans les cultures astocytaires.

La plupart des résultats tendent à montrer que la MSO n'induirait que peu de changement chez les MSO-Slow. Quelle que soit la dose injectée, le taux de convulsion n'excède pas 30% et une dose de 350mg/kg ne provoque pas d'anomalies électroencéphalographiques caractéristiques de convulsions généralisées. L'accumulation du glycogène induite par une dose de 200mg/kg est brève et peu importante. La mesure du glycogène astrocytaire *in vitro* indique cependant que la MSO conduit à une modification métabolique dans ces cellules. L'étude des glycoprotéines permet de conclure qu'il existe également une modification métabolique *in vivo*, uniquement pour la dose de 200mg/kg de MSO mais pas pour la dose de 75mg/kg. De plus, cette modification de glycosylation est identique à la modification observée chez les MSO-Fast injectées à 75mg/kg de MSO, dose convulsivante pour cette lignée.

Il existe une différence dans la glycosylation des protéines entre les MSO-Slow et les MSO-Fast, observée après injection de sérum physiologique. Cette différence est proche de la modification de la glycosylation induite par une dose convulsivante de MSO. La voie activée par la MSO et mise en évidence par la modification de la glycosylation serait donc plus active en basal chez les MSO-Slow. Cet aspect peut expliquer en partie la résistance de cette lignée.

Les variations de glycogène chez les MSO-Fast sont dues à une biosynthèse du glycogène plus rapide que sa dégradation. La faible accumulation de glycogène chez les souris MSO-Slow serait due quant à elle à une biosynthèse et un catabolisme importants. Le métabolisme du glycogène astrocytaire est notamment contrôlé par deux neurotransmetteurs monoaminergiques, la 5-HT et la NA (Allaman *et al.*, 2000 ; Laureys *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2004 ; Picard *et al.*, 2011). Aussi, une différence dans au moins une des deux voies de neurotransmission pourrait participer à la résistance ou la sensibilité à la MSO et expliquer les variations de glycogène.

L'utilisation d'un test comportemental mesurant l'anxiété, l'open field, a permis de déterminer que les souris MSO-Fast étant plus anxieuses que les souris MSO-Slow. Les principales voies impliquées dans l'anxiété sont la voie GABAergique et la voie sérotoninergique (Prut et Belzung, 2003). La voie GABAergique ayant été écartée précédemment avec l'utilisation du PTZ et du VPA, la différence d'anxiété est donc due à une différence dans la voie sérotoninergique. La libération de 5-HT permet de lutter contre l'anxiété et l'utilisation d'inhibiteurs de cette voie, comme la 8-hydroxy-2-(dipropylamino)tétraline, conduit à une augmentation des troubles de l'humeur (Prut et Belzung, 2003 ; Pucadyil *et al.*, 2005). Une diminution de la neurotransmission sérotoninergique est également souvent associée à l'épilepsie, sans toutefois qu'il est pu être établi un lien de cause à effet (Kanner, 2009).

De plus, plusieurs études ont démontré la variation des quantités d'indolamines après injection de MSO (Blizard et Balkoski, 1982 ; Hevor et Delorme, 1990 ; Picard *et al.*, 2011). Le taux de 5-HT est ainsi diminué après injection d'une dose convulsivante de MSO. L'étude par HPLC des composés de cette dernière voie indique que les MSO-Slow ont une voie sérotoninergique plus active, la quantité en produit de dégradation, le 5-HIAA, étant plus élevée pour cette lignée. Il y aurait également une tendance à l'augmentation de 5-HT après

injection de MSO chez les MSO-Slow, tendance qui peut être mise en parallèle à celle de la diminution du taux de 5-HIAA pour les MSO-Slow injectée à la MSO. Les MSO-Slow synthétisent donc de la 5-HT en grande quantité et un arrêt de la transmission sérotoninergique conduirait à une accumulation de 5-HT au niveau du bouton synaptique, expliquant ainsi la tendance à l'augmentation de la quantité de 5-HT chez les MSO-Slow, alors qu'une baisse du taux de 5-HT est observé dans d'autres modèles d'épilepsies (Hiramatsu *et al.*, 1987 ; Welsh *et al.*, 2002).

La voie noradrénergique est la seconde voie de neurotransmission impliquée dans la régulation du taux de glycogène astrocytaire (Allaman *et al.*, 2000 ; Laureys *et al.*, 2010). Il a été démontré que la neurotransmission noradrénergique joue également un rôle protecteur contre l'apparition des crises épileptiques induites par certains stimuli physiques ou chimiques, comme les stimuli auditifs ou le PTZ (Corcoran *et al.*, 1974 ; Jerlicz *et al.*, 1978). Les astrocytes sont capables de dégrader la NA par la COMT, une enzyme qui n'est pas présente dans le neurone (Eisenhofer *et al.*, 2004). Les variations du produit de dégradation correspondant, la NMA, sont donc corrélées avec la neurotransmission adrénérgique au niveau astrocytaire. Le MHPG, second produit de dégradation étudié et issu aussi bien de la NA et que de l'A, permet essentiellement d'étudier la dégradation de la NA au niveau neuronal.

Ainsi, les taux plus importants de MHPG et de NMA retrouvés chez les MSO-Slow et les MSO-Fast témoignent d'une plus grande activation de la voie noradrénergique, aussi bien au niveau astrocytaire que neuronal, pour cette lignée par rapport à la lignée MSO-Fast. Le taux de NA plus élevé chez les MSO-Slow que chez les MSO-Fast pourrait ainsi expliquer la différence de sensibilité à la MSO entre les deux lignées. La MSO induit en outre une diminution de cette voie chez les femelles MSO-Slow, se traduisant par une diminution des quantités de NA et de NMA. Les variations de la neurotransmission noradrénergique induites par la MSO sont donc astrocytaires. En revanche, aucune modification n'est enregistrée pour les MSO-Fast après injection de MSO, indiquant que les souris de cette lignée sont incapables de moduler cette voie de neurotransmission.

Les variations des composés de la voie dopaminergique étudiés confortent cette hypothèse pour les MSO-Fast. En effet, le taux de DA est plus élevé pour les MSO-Fast que pour les MSO-Slow, suggérant une plus faible activité de l'enzyme produisant la NA à partir de la DA, la DA β -hydroxylase, chez les MSO-Fast. Le rôle protecteur contre l'apparition des crises a été mis en évidence par l'utilisation de souris KO pour ce gène (Schank *et al.*, 2005). L'utilisation du VPA comme anti-convulsivant pour contrer le flurothyl, un convulsivant, est moins efficace chez les souris KO. De plus, Il a été montré une diminution simultanée de la DA et de la NA chez des rats injectés à la MSO, indiquant une activation de la voie noradrénergique (Hevor *et al.*, 1990). Cette diminution de DA a également été observée chez des souris (Samuels *et al.*, 1978). L'injection de MSO conduirait donc à un besoin en NA et de ses précurseurs pour lutter contre les crises mais les MSO-Fast seraient incapables de transformer assez de DA en NA et l'excès de DA serait alors dégradé, expliquant l'augmentation des taux de DOPAC et d'HVA pour cette lignée. Il a par ailleurs été démontré qu'une forte dose de MSO, induite par une injection intra-cérébrale, conduisait à une augmentation temporaire de DOPAC (Rothstein et Tabakoff, 1982). L'augmentation de DOPAC chez les MSO-Fast indique donc que cette lignée est très sensible à une dose de 75mg/kg de MSO.

Plusieurs études ont mis en évidence une diminution après injection de MSO des acides aminés précurseurs Tyr et Trp en même temps qu'une diminution des neurotransmetteurs correspondant (DA et NA pour la Tyr et 5-HT pour le Trp) (Blizard et Balkoski, 1982 ; Picard *et al.*, 2011 ; Samuels *et al.*, 1978). Cependant, la MSO n'induit aucune variation de la voie sérotoninergique suffisamment forte pour être significative alors que la voie noradrénergique est diminuée chez les MSO-Slow et activée chez les MSO-Fast (sans qu'il y ait *in fine* une production supplémentaire de NA). La diminution induite par la MSO des quantités de ces deux acides aminés ne peut donc pas être expliquée uniquement par le besoin en neurotransmetteur.

La MSO conduit à la néo-synthèse de nombreuses protéines, soit parce qu'elle inhibe de manière irréversible sa cible, comme la GS (Ronzio *et al.*, 1969), soit parce qu'elle conduit indirectement à un besoin, comme pour la protéine chaperonne HSP-27 (Bidmon *et al.*, 2008). La perturbation du cycle de l'ammoniaque conduit également à la nitratisation de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et par conséquent, à un besoin en cette protéine (Schliess *et al.*, 2002). De plus, l'injection de MSO induit des crises chez les animaux qui rendent difficile le déplacement pour se nourrir. Le Trp est un acide aminé essentiel pour la souris et la Tyr est synthétisée à partir d'un autre acide aminé essentiel, la Phe. Les deux phénomènes conjugués, à savoir la néo-synthèse protéique et l'absence d'alimentation, peuvent expliquer la baisse en quantité de ces deux acides aminés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Trois voies de neurotransmission ont pu être impliquées dans la différence de réponse à la MSO entre les MSO-Slow et les MSO-Fast. La voie glutamatergique est la voie de neurotransmission par laquelle les crises sont induites. Les voies de neurotransmissions sérotoninergiques et noradrénergiques permettent quant à elles de lutter contre les crises. Des différences dans les métabolismes glucidiques et glutamatergiques participent également à la latence de réponse à la MSO. Les différences mises en évidence sont listées en figure 78.



Figure 78 : Différences entre les lignées impliquées dans la réponse à la MSO

La MSO induit un rapprochement plus fort des métabolismes glutamatergiques et glucidiques en obligeant le glutamate à être recyclé par le cycle de Krebs. Une différence dans l'augmentation du taux de glycogène a été mise en évidence pour les lignées MSO-Slow et MSO-Fast par ce travail. Les enzymes impliquées dans la biosynthèse et le catabolisme doivent donc être étudiées plus en détail pour mieux comprendre l'évolution du taux de glycogène. L'étude pourra être réalisée à partir de la différence de glycosylation des protéines.

Cette étude démontre l'importance de certaines voies de neurotransmission dans l'apparition des convulsions généralisées. Aussi, la caractérisation des synapses glutamatergiques au niveau du taux de glutamate et des récepteurs pourra également apporter des réponses supplémentaires dans la détermination des mécanismes conduisant à l'apparition des convulsions généralisées. La caractérisation des récepteurs astrocytaires sérotoninergiques et adrénérergiques est également prévue afin de mieux comprendre la genèse des crises et le lien avec la régulation du taux de glycogène après injection de MSO.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott N.J., Rönnbäck L. et Hansson E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* **7**, 41-53.

Abe K. et Saito H. (1997). Developmental changes in cyclic AMP-stimulated stellation of cultured rat cortical astrocytes. *Jpn J Pharmacol.* **75**, 433-8.

Ahmad S., Fowler L.J. et Whitton P.S. (2005). Lamotrigine, carbamazepine and phenytoin differentially alter extracellular levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and amino acids. *Epilepsy Res.* **63**, 141-9.

Ahn S.K., Khalmuratova R., Jeon S.Y., Kim J.P., Park J.J., Hur D.G., Kim D.W. et Balaban C.D. (2009). Colocalization of 5-HT_{1F} receptor and glutamate in neurons of the vestibular nuclei in rats. *Neuroreport.* **20**, 111-5.

Allaman I., Pellerin L. et Magistretti P.J. (2000). Protein targeting to glycogen mRNA expression is stimulated by noradrenaline in mouse cortical astrocytes. *Glia.* **30**, 382-91.

Alvestad S., Hammer J., Eyjolfsson E., Qu H., Ottersen O.P. et Sonnewald U. (2008). Limbic Structures Show Altered Glial–Neuronal Metabolism in the Chronic Phase of Kainate Induced Epilepsy. *Neurochemical Research* **33**, 257-266.

Alvestad S., Hammer J., Qu H., Håberg A., Ottersen O.P. et Sonnewald U. (2011). Reduced astrocytic contribution to the turnover of glutamate, glutamine, and GABA characterizes the latent phase in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab.* **31**, 1675-86.

Anwyl R. (1999). Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev.* **29**, 83-120.

Applegate C.D., Samoriski G.M. et Ozduman K. (1997). Effects of valproate, phenytoin, and MK-801 in a novel model of epileptogenesis. *Epilepsia.* **38**, 631-6.

Assmann F. (1911). Beiträge zur Kenntnis pflanzlicher Agglutinine. *Arch gesam Physiol.* **137**, 489-510.

Bak L.K., Schousboe A. et Waagepetersen H.S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem.* **98**, 641-653.

Barnes N.M., Hales T.G., Lummis S.C. et Peters J.A. (2009). The 5-HT₃ receptor--the relationship between structure and function. *Neuropharmacology.* **56**, 273-84.

Bauer N.G., Richter-Landsberg C. et Ffrench-Constant C. (2009). Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia.* **57**, 1691-705.

Belzung C. et Griebel G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res.* **125**, 141-9.

- Bentley H.R., McDermott E.E. et Whitehead J.K.** (1951). Action of nitrogen trichloride on certain proteins. II. Synthesis of methionine sulphoximine and other sulphoximines. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **138**, 265-72.
- Berl S., Takagaki G., Clarke D.D. et Waelsch H.** (1962). Metabolic compartments in vivo. Ammonia and glutamic acid metabolism in brain and liver. *J Biol Chem.* **237**, 2562-9.
- Bernard-Hélary K., Ardourel M.Y., Hévor T. et Cloix J.F.** (2002). In vivo and in vitro glycogenic effects of methionine sulfoximine are different in two inbred strains of mice. *Brain Research* **929**, 147–55.
- Bernard-Hélary K., Lapouble E., Ardourel M., Hévor T. et Cloix J.F.** (2000). Correlation between brain glycogen and convulsive state in mice submitted to methionine sulfoximine. *Life Sci.* **67**, 1773-81.
- Bert B., Fink H., Rothe J., Walstab J. et Bönisch H.** (2008). Learning and memory in 5-HT(1A)-receptor mutant mice. *Behav Brain Res.* **195**, 78-85.
- Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J. et Gassmann M.** (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev.* **84**, 835-67.
- Bettler B. et Tiao J.Y.** (2006). Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacol Ther.* **110**, 533-43.
- Bidmon H.J., Görg B., Palomero-Gallagher N., Schleicher A., Häussinger D., Speckmann E.J. et Zilles K.** (2008). Glutamine synthetase becomes nitrated and its activity is reduced during repetitive seizure activity in the pentylenetetrazole model of epilepsy. *Epilepsia.* **49**, 1733-48.
- Blin M., Crusio W.E., Hévor T. et Cloix J.F.** (2002). Chronic inhibition of glutamine synthetase is not associated with impairment of learning and memory in mice. *Brain Res Bull* **57**, 11-5.
- Blizard D.A. et Balkoski V.** (1982). Tryptophan availability, central serotonergic function and methionine sulphoximine-induced convulsions. *Neuropharmacology.* **21**, 27-30.
- Blutstein T., Baab P.J., Zielke H.R. et Mong J.A.** (2009). Hormonal modulation of amino acid neurotransmitter metabolism in the arcuate nucleus of the adult female rat: a novel action of estradiol. *Endocrinology.* **150**, 3237-44.
- Boissonnet A., Hévor T. et Cloix J.F.** (2011). Brain glycogen and methionine sulfoximine-dependent epilepsy. In *Epilepsy / Book 6 (Intech)*, pp. sous presse.
- Borges K., Gearing M., McDermott D.L., Smith A.B., Almonte A.G., Wainer B.H. et Dingledine R.** (2003). Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol.* **182**, 21-34.
- Bourcier S., Benoit J.F., Clerc F., Rigal O., Taghi M. et Hoppilliard Y.** (2006). Detection of 28 neurotransmitters and related compounds in biological fluids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **20**, 1405-21.
- Bowie D.** (2010). Ion-dependent gating of kainate receptors. *J Physiol.* **588**, 67-81.
- Bozzi Y., Vallone D. et Borrelli E.** (2000). Neuroprotective role of dopamine against hippocampal cell death. *J Neurosci.* **20**, 8643-9.
- Bradford H.F.** (1995). Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol.* **47**, 477-511.

- Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-54.
- Braza-Boïls A., Tomás M., Marín M.P., Megías L., Sancho-Tello M., Fornas E. et Renau-Piqueras J.** (2006). Glycosylation is altered by ethanol in rat hippocampal cultured neurons. *Alcohol Alcohol.* **41**, 494-504.
- Bröer S., Schneider H.P., Bröer A. et Deitmer J.W.** (2009). Mutation of asparagine 76 in the center of glutamine transporter SNAT3 modulates substrate-induced conductances and Na⁺ binding. *J Biol Chem.* **284**, 25823-31.
- Brusa R., Zimmermann F., Koh D.S., Feldmeyer D., Gass P., Seeburg P.H. et Sprengel R.** (1995). Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science.* **270**, 1677-80.
- Buch K., Blumenfeld H., Spencer S., Novotny E. et Zubal I.G.** (2008). Evaluating the accuracy of perfusion/metabolism (SPET/PET) ratio in seizure localization. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **35**, 579-588.
- Buckholtz N.S.** (1975). Anticonvulsant effects of 6-methoxy-1, 2, 3, 4-tetrahydro-alpha-carboline on audiogenic and electroconvulsive seizures in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* **3**, 65-8.
- Butt A.M., Hamilton N., Hubbard P., Pugh M. et Ibrahim M.** (2005). Synantocytes: the fifth element. *J Anat.* **207**, 695-706.
- Cappiello A., Famigliani G., Mangani F. et Palma P.** (2001). New trends in the application of electron ionization to liquid chromatography-mass spectrometry interfacing. *Mass Spectrom Rev.* **20**, 88-104.
- Capuano B., Crosby I.T., McRobb F.M., Taylor D.A., Vom A. et Blessing W.W.** (2010). JL13 has clozapine-like actions on thermoregulatory cutaneous blood flow in rats: Involvement of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mechanisms. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **34**, 136-42.
- Cavus I., Kasoff W.S., Cassaday M.P., Jacob R., Gueorguieva R., Sherwin R.S., Krystal J.H., Spencer D.D. et Abi-Saab W.M.** (2005). Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Ann Neurol.* **57**, 226-35.
- Chang Y.F. et Myslinski N.R.** (1985). Effects of L-lysine and its metabolites on pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurosci Lett.* **59**, 79-84.
- Chapouthier G., Launay J.M., Venault P., Breton C., Roubertoux P.L. et Crusio W.E.** (1998). Genetic selection of mouse lines differing in sensitivity to a benzodiazepine receptor inverse agonist. *Brain Res.* **787**, 85-90.
- Chateauvieux S., Morceau F., Dicato M. et Diederich M.** (2010). Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol.* **479364**.
- Chaudhry F.A., Reimer R.J. et Edwards R.H.** (2002). The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *J Cell Biol.* **157**, 349-55.
- Chirita R.I.** (2009). Développement de nouvelles méthodes séparatives compatibles avec une détection par spectrométrie de masse et par électrochimie pour l'analyse de traces de catécholamines et molécules apparentées. *Thèse de l'Université d'Orléans*, 58-63.

- Chirita R.I., Finaru A.L. et Elfakir C.** (2011). Evaluation of fused-core and monolithic versus porous silica-based C18 columns and porous graphitic carbon for ion-pairing liquid chromatography analysis of catecholamines and related compounds. *J Chromatogr B.* **879**, 633-40.
- Christopherson K.S., Ullian E.M., Stokes C.C., MULLowney C.E., Hell J.W., Agah A., Lawler J., Mosher D.F., Bornstein P. et Barres B.A.** (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell.* **120**, 421-33.
- Chung S.H. et Johnson M.S.** (1984). Studies on sound-induced epilepsy in mice. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **221**, 145-68.
- Ci S., Ren T. et Su Z.** (2007). Investigating the putative binding-mode of GABA and diazepam within GABA A receptor using molecular modeling. *Protein J.* **27**, 71-8.
- Clark K.A., Shin A.C., Sirivelu M.P., Mohankumar S.M. et Mohankumar P.S.** (2008). Systemic administration of leptin decreases plasma corticosterone levels: role of hypothalamic norepinephrine. *Brain Res.* **1195**, 89-95.
- Cloix J.F. et Hévor T.** (2009). Epilepsy, regulation of brain energy metabolism and neurotransmission. *Curr Med Chem.* **16**, 841-53.
- Cloix J.F., Tahi Z., Boissonnet A. et Hévor T.** (2010a). Brain glycogen and neurotransmitter levels in fast and slow methionine sulfoximine-selected mice. *Exp. Neurol* **225**, 274-83.
- Cloix J.F., Tahi Z., Martin B. et Hévor T.** (2010b). Selection of two lines of mice based on latency to onset of methionine sulfoximine seizures. *Epilepsia* **51**, 118-28.
- Collingridge G.L., Olsen R.W., Peters J. et Spedding M.** (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology.* **56**, 2-5.
- Cooper A.J., McDonald J.M., Gelbard A.S., Gledhill R.F. et Duffy T.E.** (1979). The metabolic fate of ¹³N-labeled ammonia in rat brain. *J Biol Chem.* **254**, 4982-92.
- Corcoran M.E., Fibiger H.C., McCaughran J.A. (Jr.) et Wada J.A.** (1974). Potentiation of amygdaloid kindling and metrazol-induced seizures by 6-hydroxydopamine in rats. *Exp Neurol.* **45**, 118-33.
- Cotton J.L. et Partin K.M.** (2000). The contributions of GluR2 to allosteric modulation of AMPA receptors. *Neuropharmacology.* **39**, 21-31.
- Cremer C.M., Bidmon H.J., Görg B., Palomero-Gallagher N., Escobar J.L., Speckmann E.J. et Zilles K.** (2010). Inhibition of glutamate/glutamine cycle in vivo results in decreased benzodiazepine binding and differentially regulated GABAergic subunit expression in the rat brain. *Epilepsia.* **51**, 1446-55.
- Crerar M.M., Karlsson O., Fletterick R.J. et Hwang P.K.** (1995). Chimeric muscle and brain glycogen phosphorylases define protein domains governing isozyme-specific responses to allosteric activation. *J Biol Chem.* **270**, 13748-56.
- Crusio W.E., Schwegler H. et Brust I.** (1993). Covariations between hippocampal mossy fibres and working and reference memory in spatial and non-spatial radial maze tasks in mice. *Eur J Neurosci* **5**, 1413-20.
- Cubelos B., González-González I.M., Giménez C. et Zafra F.** (2005). Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia.* **49**, 230-44.

- Cummins C.J., Lust W.D. et Passonneau J.V.** (1983). Regulation of glycogenolysis in transformed astrocytes in vitro. *J Neurochem.* **40**, 137-44.
- D'Hooge R. et De Deyn P.P.** (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev.* **36**, 60-90.
- D'Hulst C., Atack J.R. et Kooy R.F.** (2009). The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discov Today.* **14**, 866-75.
- Dadsetan S., Bak L.K., Sørensen M., Keiding S., Vilstrup H., Ott P., Leke R., Schousboe A. et Waagepetersen H.S.** (2011). Inhibition of glutamine synthesis induces glutamate dehydrogenase-dependent ammonia fixation into alanine in co-cultures of astrocytes and neurons. *Neurochem Int.* **59**, 482-8.
- Dalsgaard M.K., Madsen F.F., Secher N.H., Laursen H. et Quistorff B.** (2007). High glycogen levels in the hippocampus of patients with epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab.* **27**, 1137-41.
- Danbolt N.C.** (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* **65**, 1-105.
- Davies P.A., Pistis M., Hanna M.C., Peters J.A., Lambert J.J., Hales T.G. et Kirkness E.F.** (1999). The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature.* **397**, 359-63.
- Deitmer J.W., Bröer A. et Bröer S.** (2003). Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways. *J Neurochem.* **87**, 127-35.
- Del Bigio M.R.** (2010). Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 55-73.
- Denter D.G., Heck N., Riedemann T., White R., Kilb W. et Luhmann H.J.** (2010). GABAC receptors are functionally expressed in the intermediate zone and regulate radial migration in the embryonic mouse neocortex. *Neuroscience.* **167**, 124-34.
- Dhami G.K. et Ferguson S.S.** (2006). Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol Ther.* **111**, 260-71.
- Dixson T.** (1887). On the active principle of castor oil. *Med Chir Trans.* **70**, 107-16.
- Drago A., Alboni S., Brunello N., De Ronchi D. et Serretti A.** (2010). HTR1B as a risk profile maker in psychiatric disorders: a review through motivation and memory. *Eur J Clin Pharmacol.* **66**, 5-27.
- Duarte F.S., Marder M., Hoeller A.A., Duzzioni M., Mendes B.G., Pizzolatti M.G. et De Lima T.C.** (2008). Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. *Psychopharmacology (Berl).* **197**, 351-60.
- Dube D.H. et Bertozzi C.R.** (2005). Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov.* **4**, 477-88.
- Dudel J. et Kuffler S.W.** (1961). Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol.* **155**, 543-62.
- Duvoisin R.M., Pfankuch T., Wilson J.M., Grabell J., Chhajlani V., Brown D.G., Johnson E. et Raber J.** (2010). Acute pharmacological modulation of mGluR8 reduces measures of anxiety. *Behav Brain Res.* **212**, 168-73.

- Duxon M.S., Kennett G.A., Lightowler S., Blackburn T.P. et Fone K.C.** (1997). Activation of 5-HT_{2B} receptors in the medial amygdala causes anxiolysis in the social interaction test in the rat. *Neuropharmacology*. **36**, 601-8.
- Dziedzicka-Wasylewska M.** (2004). Brain dopamine receptors--research perspectives and potential sites of regulation. *Pol J Pharmacol*. **56**, 659-71.
- Eid T., Ghosh A., Wang Y., Beckström H., Zaveri H.P., Lee T.S., Lai J.C., Malthankar-Phatak G.H. et De Lanerolle N.C.** (2008). Recurrent seizures and brain pathology after inhibition of glutamine synthetase in the hippocampus in rats. *Brain*. **131**, 2061-70.
- Eid T., Thomas M.J., Spencer D.D., Rundén-Pran E., Lai J.C., Malthankar G.V., Kim J.H., Danbolt N.C., Ottersen O.P. et de Lanerolle N.C.** (2004). Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet*. **363**, 38-37.
- Eisenhofer G., Kopin I.J. et Goldstein D.S.** (2004). Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev*. **56**, 331-49.
- Fan X., She Y.M., Bagshaw R.D., Callahan J.W., Schachter H. et Mahuran D.J.** (2004). A method for proteomic identification of membrane-bound proteins containing Asn-linked oligosaccharides. *Anal Biochem*. **332**, 178-86.
- Fauler G., Leis H.J., Huber E., Schellauf C., Kerbl R., Urban C. et Gleispach H.** (1997). Determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in neuroblastoma screening by stable isotope dilution GC-MS. *J Mass Spectrom*. **32**, 507-14.
- Feldman D.E., Nicoll R.A. et Malenka R.C.** (1999). Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, and silent synapses. *J Neurobiol*. **41**, 92-101.
- Felipo V. et Butterworth R.F.** (2002). Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol*. **67**, 259-79.
- Ferraro T.N., Smith G.G., Schwebel C.L., Doyle G.A., Ruiz S.E., Oleynick J.U., Lohoff F.W., Berrettini W.H. et Buono R.J.** (2010). Confirmation of multiple seizure susceptibility QTLs on chromosome 15 in C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. *Physiol Genomics*. **42A**, 1-7.
- Fiumara A., Pittalà A., Cocuzza M. et Sorge G.** (2010). Epilepsy in patients with Angelman syndrome. *Ital J Pediatr*. **36**.
- Folbergrová J.** (1980). Cyclic GMP and cyclic AMP in the cerebral cortex of mice during seizures induced by 3-mercaptopropionic acid: effects of anticonvulsant agents. *Neurosci Lett*. **16**, 291-6.
- Folbergrová J., Passonneau J.V., Lowry O.H. et Schulz D.W.** (1969). Glycogen, ammonia and related metabolites in the brain during seizures evoked by methionine sulfoximine. *J Neurochem*. **16**, 191-203.
- Fonnum F. et Paulsen R.E.** (1990). Comparison of transmitter amino acid levels in rat globus pallidus and neostriatum during hypoglycemia or after treatment with methionine sulfoximine or gamma-vinyl gamma-aminobutyric acid. *J Neurochem*. **54**, 1253-7.
- Francis H.M., Kraushaar N.J., Hunt L.R. et Cornish J.L.** (2011). Serotonin 5-HT₄ receptors in the nucleus accumbens are specifically involved in the appetite suppressant and

not locomotor stimulant effects of MDMA ('ecstasy'). *Psychopharmacology (Berl)*. **213**, 355-63.

Franz S., Frey B., Sheriff A., Gaipf U.S., Beer A., Voll R.E., Kalden J.R. et Herrmann M. (2006). Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. *Cytometry A*. **6**, 230-9.

Fuster M.M. et Esko J.D. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. **5**, 526-42.

Gavrilyuk V., Dello Russo C., Heneka M.T., Pelligrino D., Weinberg G. et Feinstein D.L. (2002). Norepinephrine increases I kappa B alpha expression in astrocytes. *J Biol Chem*. **277**, 29662-8.

Gee J.R. et Keller J.N. (2005). Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol*. **37**, 1145-50.

Gegelashvili M., Rodriguez-Kern A., Pirozhkova I., Zhang J., Sung L. et Gegelashvili G. (2006). High-affinity glutamate transporter GLAST/EAAT1 regulates cell surface expression of glutamine/neutral amino acid transporter ASCT2 in human fetal astrocytes. *Neurochem Int*. **48**, 611-5.

Gibbs M.E. et Summers R.J. (2002). Role of adrenoceptor subtypes in memory consolidation. *Prog Neurobiol*. **67**, 345-91.

Ginefri-Gayet M. et Gayet J. (1988). Study of the hypothermia induced by methionine sulfoximine in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **91**, 797-802.

Gliddon C.M., Shao Z., LeMaistre J.L. et Anderson C.M. (2009). Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain. *J Neurochem*. **108**, 372-83.

Glowinski J. et Iversen L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. 3. Subcellular distribution of endogenous and exogenous catecholamines in various brain regions. *Biochem Pharmacol*. **15**, 977-87.

Goddard G.V. (1967). Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature*. **214**, 1020-1.

Goldstein I.J., Hughes R.C., Monsigny M., Osawa T. et Sharon N. (1980). What should be called a lectin? *Nature*. **285**, 66.

González-Burgos I. et Feria-Velasco A. (2008). Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Prog Brain Res*. **172**, 603-23.

Graeber M.B., Scheithauer B.W. et Kreutzberg G.W. (2002). Microglia in brain tumors. *Glia*. **40**, 252-9.

Granados-Soto V., Argüelles C.F., Rocha-González H.I., Godínez-Chaparro B., Flores-Murrieta F.J. et Villalón C.M. (2010). The role of peripheral 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E and 5-HT1F serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience*. **165**, 561-8.

Greenberg D.A. et Subaran R. (2011). Blinders, phenotype, and fashionable genetic analysis: a critical examination of the current state of epilepsy genetic studies. *Epilepsia*. **52**, 1-9.

- Griffith O.W. et Meister A.** (1978). Differential inhibition of glutamine and gamma-glutamylcysteine synthetases by alpha-alkyl analogs of methionine sulfoximine that induce convulsions. *J Biol Chem.* **253**, 2333-8.
- Groc L. et Choquet D.** (2006). AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell Tissue Res.* **326**, 423-38.
- Gu W.H., Yang S., Shi W.X., Jin G.Z. et Zhen X.C.** (2007). Requirement of PSD-95 for dopamine D1 receptor modulating glutamate NR1a/NR2B receptor function. *Acta Pharmacol Sin.* **28**, 756-62.
- Gupta G., Surolia A. et Sampathkumar S.G.** (2010). Lectin microarrays for glycomic analysis. *OMICS.* **14**, 419-36.
- Gur R.C., Mozley L.H., Mozley P.D., Resnick S.M., Karp J.S., Alavi A., Arnold S.E. et Gur R.E.** (1995). Sex differences in regional cerebral glucose metabolism during a resting state. *Science.* **267**, 528-31.
- Gurbanova A.A., Aker R., Berkman K., Onat F.Y., van Rijn C.M. et van Luijtelaar G.** (2006). Effect of systemic and intracortical administration of phenytoin in two genetic models of absence epilepsy. *Br J Pharmacol.* **148**, 1076-82.
- Hakamata Y., Iwase M., Iwata H., Kobayashi T., Tamaki T., Nishio M., Matsuda H., Ozaki N. et Inada T.** (2009). Gender difference in relationship between anxiety-related personality traits and cerebral brain glucose metabolism. *Psychiatry Res.* **173**, 206-11.
- Hamilton S.E. et Nathanson N.M.** (2001). The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. *J Biol Chem.* **276**, 15850-3.
- Hashimoto K., Sawa A. et Iyo M.** (2007). Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry.* **62**, 1310-6.
- Hassel B. et Sonnewald U.** (1995). Glial formation of pyruvate and lactate from TCA cycle intermediates: implications for the inactivation of transmitter amino acids? *J Neurochem.* **65**, 2227-34.
- Havlickova M., Prezeau L., Duthey B., Bettler B., Pin J.P. et Blahos J.** (2002). The intracellular loops of the GB2 subunit are crucial for G-protein coupling of the heteromeric gamma-aminobutyrate B receptor. *Mol Pharmacol.* **62**, 343-50.
- He J., Liu Y., Xie X., Zhu T., Soules M., DiMeco F., Vescovi A.L., Fan X. et Lubman D.M.** (2010). Identification of cell surface glycoprotein markers for glioblastoma-derived stem-like cells using a lectin microarray and LC-MS/MS approach. *J Proteome Res.* **9**, 2565-72.
- Hevor T.K., Aissi E. et Delorme P.** (1990). Correlation between carbohydrate and catecholamine level impairments in methionine sulfoximine epileptogenic rat brain. *Neurochem Res.* **15**, 861-8.
- Hevor T.K. et Delorme P.** (1990). Possible involvement of indolamines in the glycogenic effect of the convulsant methionine sulfoximine in rat brain. *Experientia* **46**, 710-3.
- Hevor T.K., Delorme P. et Beauvillain J.C.** (1986). Glycogen synthesis and immunocytochemical study of fructose-1,6-biphosphatase in methionine sulfoximine epileptogenic rodent brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* **6**, 292-7.

Hiki Y. (2009). O-linked oligosaccharides of the IgA1 hinge region: roles of its aberrant structure in the occurrence and/or progression of IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* **13**, 415-23.

Hiki Y., Odani H., Takahashi M., Yasuda Y., Nishimoto A., Iwase H., Shinzato T., Kobayashi Y. et Maeda K. (2001). Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney Int.* **59**, 1077-85.

Hiramatsu M., Ogawa K., Kabuto H. et Mori A. (1987). Reduced uptake and release of 5-hydroxytryptamine and taurine in the cerebral cortex of epileptic El mice. *Epilepsy Res.* **1**, 40-5.

Hirrlinger J., Hülsmann S. et Kirchhoff F. (2004). Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur J Neurosci.* **20**, 2235-9.

Hogg S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* **54**, 21-30.

Homayoun H., Khavandgar S. et Dehpour A.R. (2002). Anticonvulsant effects of cyclosporin A on pentylenetetrazole-induced seizure and kindling: modulation by nitricoxidergic system. *Brain Res.* **939**, 1-10.

Huo J.Z., Dykstra C.M. et Gurd J.W. (2006). Increase in tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor following the induction of status epilepticus. *Neurosci Lett.* **401**, 266-70.

Hutchins D.A. et Rogers K.J. (1970). Physiological and drug-induced changes in the glycogen content of mouse brain. *Br J Pharmacol* **39**, 9-25.

Iles J.F. et Hamilton H. (1976). Effects of glutamate and sulphur containing amino acids on ammonia toxicity and methionine sulphoximine convulsions in mice. *Brain Res.* **109**, 553-62.

Inbar M. et Sachs L. (1969). Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells. *Nature.* **223**, 710-2.

Ito H., Kuno A., Sawaki H., Sogabe M., Ozaki H., Tanaka Y., Mizokami M., Shoda J., Angata T., Sato T. et al. (2009). Strategy for glycoproteomics: identification of glyco-alteration using multiple glycan profiling tools. *J Proteome Res.* **8**, 1358-67.

Jazrawi S.P. et Horton R.W. (1989). 5-HT₂ receptor binding and 5-HT uptake in mouse brain: developmental changes and the relationship to audiogenic seizure susceptibility in DBA/2J mice. *Brain Res Dev Brain Res.* **45**, 257-63.

Jeannoda V.L., Rakoto-Ranoromalala D.A., Valisolalao J., Creppy E.E. et Dirheimer G. (1985). Natural occurrence of methionine sulfoximine in the Connaraceae family. *J Ethnopharmacol.* **14**, 11-7.

Jerlicz M., Kostowski W., Bidzinski A. et Hauptmann M. (1978). Audiogenic seizure susceptibility in rats with lesioned raphe nuclei and treated with p-chlorophenylalanine. *Pol J Pharmacol Pharm.* **30**, 63-8.

Ji C., Walton J., Su Y. et Tella M. (2010). Simultaneous determination of plasma epinephrine and norepinephrine using an integrated strategy of a fully automated protein precipitation technique, reductive ethylation labeling and UPLC-MS/MS. *Anal Chim Acta.* **670**, 84-91.

Jiang X., Ye M. et Zou H. (2008). Technologies and methods for sample pretreatment in efficient proteome and peptidome analysis. *Proteomics.* **8**, 686-705.

- Johnson L.N.** (1992). Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J.* **6**, 2274-82.
- Kaila K., Lamsa K., Smirnov S., Taira T. et Voipio J.** (1997). Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient. *J Neurosci.* **17**, 7662-72.
- Kalynchuk L.E., Pinel J.P. et Meaney M.J.** (2006). Serotonin receptor binding and mRNA expression in the hippocampus of fearful amygdala-kindled rats. *Neurosci Lett.* **396**, 38-43.
- Kanner A.M.** (2009). Psychiatric issues in epilepsy: the complex relation of mood, anxiety disorders, and epilepsy. *Epilepsy Behav.* **15**, 83-7.
- Kawasaki N., Itoh S., Harazono A., Hashii N., Matsuishi Y., Hayakawa T. et Kawanishi T.** (2005). Mass spectrometry of glycoproteins. *Trends glycosc glycotech.* **17**, 193-203.
- Kelly M.A., Rubinstein M., Asa S.L., Zhang G., Saez C., Bunzow J.R., Allen R.G., Hnasko R., Ben-Jonathan N., Grandy D.K. et al.** (1997). Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron.* **19**, 103-13.
- Kew J.N. et Kemp J.A.** (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl).* **179**, 4-29.
- Khakh B.S. et Henderson G.** (2000). Modulation of fast synaptic transmission by presynaptic ligand-gated cation channels. *J Auton Nerv Syst.* **81**, 110-21.
- Kheirbek M.A., Beeler J.A., Ishikawa Y. et Zhuang X.** (2008). A cAMP pathway underlying reward prediction in associative learning. *J Neurosci.* **28**, 11401-8.
- Kim D.K., Kim I.J., Hwang S., Kook J.H., Lee M.C., Shin B.A., Bae C.S., Yoon J.H., Ahn S.G., Kim S.A. et al.** (2004). System L-amino acid transporters are differently expressed in rat astrocyte and C6 glioma cells. *Neurosci Res.* **50**, 437-46.
- King M.V., Marsden C.A. et Fone K.C.** (2008). A role for the 5-HT(1A), 5-HT4 and 5-HT6 receptors in learning and memory. *Trends Pharmacol Sci.* **29**, 482-92.
- Kornfeld R. et Kornfeld S.** (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* **54**, 631-64.
- Kornhuber J., Mack-Burkhardt F., Kornhuber M.E. et Riederer P.** (1989). [3H]MK-801 binding sites in post-mortem human frontal cortex. *Eur J Pharmacol.* **162**, 483-90.
- Kovacic P. et Somanathan R.** (2010). Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. *Oxid Med Cell Longev.* **3**, 13-22.
- Krawczyk A. et Jaworska-Adamu J.** (2010). Synantocytes: the fifth type of glia? In comparison with astrocytes. *Folia Histochem Cytobiol.* **48**, 173-7.
- Kreutzberg G.W.** (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **19**, 312-8.
- Krystal J.H., Mathew S.J., D'Souza D.C., Garakani A., Gunduz-Bruce H. et Charney D.S.** (2010). Potential psychiatric applications of metabotropic glutamate receptor agonists and antagonists. *CNS Drugs.* **24**, 669-93.

- Kuhl D.E., Engel J.Jr, Phelps M.E. et Selin C.** (1980). Epileptic patterns of local cerebral metabolism and perfusion in humans determined by emission computed tomography of 18FDG and 13NH3. *Ann Neurol.* **8**, 348-60.
- Kvamme E., Torgner I.A. et Roberg B.** (2001). Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. *J Neurosci Res.* **66**, 951-8.
- Lai V., Mak H.K.F., Yung A.W.Y., Ho W.Y. et Hung K.N.** (2010). Neuroimaging techniques in epilepsy. *Hong Kong Med J* **16**, 192-8.
- Lajtha A. et Sershen H.** (2010). Heterogeneity of reward mechanisms. *Neurochem Res.* **35**, 851-67.
- Lamar C.Jr. et Sellinger O.Z.** (1965). The inhibition in vivo of cerebral glutamine synthetase and glutamine transferase by the convulsant methionine sulfoximine. *Biochem Pharmacol.* **14**, 489-56.
- Landemarre L. et Duverger E.** (2011). Lectin glycoprofiling of recombinant therapeutic Interleukin-7. *Methods Mol Biol.*, sous presse.
- Landolt H.P. et Wehrle R.** (2009). Antagonism of serotonergic 5-HT2A/2C receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood? *Eur J Neurosci.* **29**, 1795-809.
- Laureys G., Clinckers R., Gerlo S., Spooren A., Wilczak N., Kooijman R., Smolders I., Michotte Y. et De Keyser J.** (2010). Astrocytic beta(2)-adrenergic receptors: from physiology to pathology. *Prog Neurobiol.* **91**, 189-99.
- Le Duigou C., Holden T. et Kullmann D.M.** (2011). Short- and long-term depression at glutamatergic synapses on hippocampal interneurons by group I mGluR activation. *Neuropharmacology.* **60**, 748-56.
- Lehre K.P. et Danbolt N.C.** (1998). The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci.* **18**, 8751-7.
- Lehtinen M.K., Tegelberg S., Schipper H., Su H., Zukor H., Manninen O., Kopra O., Joensuu T., Hakala P., Bonni A. et al.** (2009). Cystatin B deficiency sensitizes neurons to oxidative stress in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. *J Neurosci.* **29**, 5910-5.
- Li C., Xu B., Wang W.W., Yu X.J., Zhu J., Yu H.M., Han D., Pei D.S. et Zhang G.Y.** (2010). Coactivation of GABA receptors inhibits the JNK3 apoptotic pathway via disassembly of GluR6-PSD-95-MLK3 signaling module in KA-induced seizure. *Epilepsia* **51**, 391-403.
- Li X., Zhu W., Roh M.S., Friedman A.B., Rosborough K. et Jope R.S.** (2004). In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology.* **29**, 1426-31.
- Liang S.L., Carlson G.C. et Coulter D.A.** (2006). Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. *J Neurosci.* **26**, 8537-48.
- LIPID MAPS.** (2011). Lipidomics gateway. <http://www.lipidmaps.org/>.
- Lomeli H., Sprengel R., Laurie D.J., Köhr G., Herb A., Seeburg P.H. et Wisden W.** (1993). The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett.* **315**, 318-22.

- Long K.D., Mastropaolo J., Rosse R.B., Manaye K.F. et Deutsch S.I.** (2006). Modulatory effects of d-serine and sarcosine on NMDA receptor-mediated neurotransmission are apparent after stress in the genetically inbred BALB/c mouse strain. *Brain Res Bull.* **69**, 626-30.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et Randall R.J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**, 265-75.
- Lowry O.H., Schulz D.W. et Passonneau J.V.** (1967). The kinetics of glycogen phosphorylases from brain and muscle. *J Biol Chem.* **242**, 271-80.
- Lucas G., Rymar V.V., Du J., Mnie-Filali O., Bisgaard C., Manta S., Lambas-Senas L., Wiborg O., Haddjeri N., Piñeyro G. et al.** (2007). Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron.* **55**, 712-25.
- Ma D.K., Ming G.L. et Song H.** (2005). Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* **15**, 514-20.
- Mac M. et Nalecz K.A.** (2003). Expression of monocarboxylic acid transporters (MCT) in brain cells. Implication for branched chain alpha-ketoacids transport in neurons. *Neurochem Int.* **43**, 305-9.
- MacDonald J.F., Mody I. et Salter M.W.** (1989). Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors revealed by intracellular dialysis of murine neurones in culture. *J Physiol.* **414**, 17-34.
- Makar T.K., Nedergaard M., Preuss A., Hertz L. et Cooper A.J.** (1994). Glutamine transaminase K and omega-amidase activities in primary cultures of astrocytes and neurons and in embryonic chick forebrain: marked induction of brain glutamine transaminase K at time of hatching. *J Neurochem.* **62**, 1983-8.
- Malatesta P., Appolloni I. et Calzolari F.** (2008). Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res.* **331**, 165-78.
- Manning J.M., Moore S., Rowe W.B. et Meister A.** (1969). Identification of L-methionine S-sulfoximine as the diastereoisomer of L-methionine SR-sulfoximine that inhibits glutamine synthetase. *Biochemistry.* **8**, 2681-5.
- Manzke T., Guenther U., Ponimaskin E.G., Haller M., Dutschmann M., Schwarzacher S. et Richter D.W.** (2003). 5-HT4(a) receptors avert opioid-induced breathing depression without loss of analgesia. *Science.* **301**, 226-9.
- Marcaggi P. et Coles J.A.** (2000). Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog Neurobiol.* **64**, 157-83.
- Marcus M.M., Wiker C., Frånberg O., Konradsson-Geuken A., Langlois X., Jardemark K. et Svensson T.H.** (2010). Adjunctive alpha2-adrenoceptor blockade enhances the antipsychotic-like effect of risperidone and facilitates cortical dopaminergic and glutamatergic, NMDA receptor-mediated transmission. *Int J Neuropsychopharmacol.* **13**, 891-903.
- Mares P., Mikulecká A., Tichá K., Lojková-Janecková D. et Kubová H.** (2010). Metabotropic glutamate receptors as a target for anticonvulsant and anxiolytic action in immature rats. *Epilepsia.* **51**, 24-26.
- Margeta-Mitrovic M., Jan Y.N. et Jan L.Y.** (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron.* **27**, 97-106.

- Marrosu F., Bortolato M., Frau R., Orrù M., Puligheddu M., Fà M., Muroi A., Tuveri A. et Mereu G.** (2007). Levetiracetam attenuates spontaneous spike-and-wave discharges in DBA/2J mice. *Epilepsy Res.* **75**, 224-7.
- Marrosu F., Santoni F., Fà M., Puligheddu M., Barberini L., Genugu F., Frau R., Manunta M. et Mereu G.** (2006). Beta and gamma range EEG power-spectrum correlation with spiking discharges in DBA/2J mice absence model: role of GABA receptors. *Epilepsia.* **47**, 489-94.
- Marshall F.H., Jones K.A., Kaupmann K. et Bettler B.** (1999). GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci.* **20**, 396-9.
- Mårtensson J., Steinherz R., Jain A. et Meister A.** (1989). Glutathione ester prevents buthionine sulfoximine-induced cataracts and lens epithelial cell damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**, 8727-31.
- Martinez-Hernandez A., Bell K.P. et Norenberg M.D.** (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science.* **195**, 1356-8.
- Matthys A., Haegeman G., Van Craenenbroeck K. et Vanhoenacker P.** (2011). Role of the 5-HT7 Receptor in the Central Nervous System: from Current Status to Future Perspectives. *Mol Neurobiol.* **43**, 228-53.
- Maxson S.C., Fine M.D., Ginsburg B.E. et Koniecki D.L.** (1983). A mutant for spontaneous seizures in C57BL/10Bg mice. *Epilepsia.* **24**, 15-24.
- Mazzola-Pomietto P., Aulakh C.S., Tolliver T. et Murphy D.L.** (1997). Functional subsensitivity of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors mediating hyperthermia following acute and chronic treatment with 5-HT_{2A/2C} receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl).* **130**, 144-51.
- McIntyre D.C., Poulter M.O. et Gilby K.** (2002). Kindling: some old and some new. *Epilepsy Res.* **50**, 79-92.
- McKenna M.C., Sonnewald U., Huang X., Stevenson J. et Zielke H.R.** (1996). Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem.* **66**, 386-93.
- McKhann G.M. 2nd., Wenzel H.J., Robbins C.A., Sosunov A.A. et Schwartzkroin P.A.** (2003). Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. *Neuroscience.* **122**, 551-61.
- Mefford I.N.** (1981). Application of high performance liquid chromatography with electrochemical detection to neurochemical analysis: measurement of catecholamines, serotonin and metabolites in rat brain. *J Neurosci Methods.* **3**, 207-24.
- Melone M., Quagliano F., Barbares i P., Varoqui H., Erickson J.D. et Conti F.** (2004). Localization of the glutamine transporter SNAT1 in rat cerebral cortex and neighboring structures, with a note on its localization in human cortex. *Cereb Cortex.* **14**, 562-74.
- Melone M., Varoqui H., Erickson J.D. et Conti F.** (2006). Localization of the Na(+)-coupled neutral amino acid transporter 2 in the cerebral cortex. *Neuroscience.* **140**, 281-92.
- Messer W.S.Jr., Ellerbrock B.R. et Bohnett M.** (1991). Regulation of muscarinic receptors by intrahippocampal injections of gallamine. *Brain Res.* **564**, 73-8.

- Miguel-Hidalgo J.J., Waltzer R., Whittom A.A., Austin M.C., Rajkowska G. et Stockmeier C.A.** (2010). Glial and glutamatergic markers in depression, alcoholism, and their comorbidity. *J Affect Disord.* **127**, 230-40.
- Miller S.I., Ernst R.K. et Bader M.W.** (2005). LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol.* **3**, 36-46.
- Miyazawa A., Fujiyoshi Y. et Unwin N.** (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature.* **423**, 949-55.
- Möhler H. et Fritschy J.M.** (1999). GABAB receptors make it to the top as dimers. *Trends Pharmacol Sci.* **20**, 87-9.
- Mong J.A. et Blutstein T.** (2006). Estradiol modulation of astrocytic form and function: implications for hormonal control of synaptic communication. *Neuroscience.* **138**, 967-75.
- Morell A.G., Irvine R.A., Sternlieb I., Scheinberg I.H. et Ashwell G.** (1968). Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo. *J Biol Chem.* **243**, 155-9.
- Morelle W., Faid V., Chirat F. et Michalski J.C.** (2007). Analysis of N- and O-linked glycans from glycoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* **534**, 5-21.
- Moriyama Y. et Omote H.** (2008). Vesicular glutamate transporter acts as a metabolic regulator. *Biol Pharm Bull.* **31**, 1844-6.
- Mott D.D., Benveniste M. et Dingledine R.J.** (2001). pH-dependent inhibition of kainate receptors by zinc. *J Neurosci.* **28**, 1659-71.
- Mula M. et Monaco F.** (2009). Antiepileptic drugs and psychopathology of epilepsy: an update. *Epileptic Disord.* **11**, 1-9.
- Müller C.J., Gröticke I., Hoffmann K., Schughart K. et Löscher W.** (2009). Differences in sensitivity to the convulsant pilocarpine in substrains and sublines of C57BL/6 mice. *Genes Brain Behav.* **8**, 481-92.
- Nakanishi T., Sugawara M., Huang W., Martindale R.G., Leibach F.H., Ganapathy M.E., Prasad P.D. et Ganapathy V.** (2001). Structure, function, and tissue expression pattern of human SN2, a subtype of the amino acid transport system N. *Biochem Biophys Res Commun.* **281**, 1343-8.
- Nankai M., Klarica M., Fage D. et Carter C.** (1998). The pharmacology of native N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: different receptors control the release of different striatal and spinal transmitters. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **22**, 35-64.
- Naseer M.I., Lee H.Y., Ullah N., Ullah I., Park M.S. et Kim M.O.** (2011). siRNA-mediated GABA(B) receptor at early fetal rat brain upon acute and chronic ethanol exposure: down regulation of PKA and p-CREB expression. *Synapse.* **65**, 109-18.
- Naseer M.I., Lee H.Y., Ullah N., Ullah I., Park M.S., Kim S.H. et Kim M.O.** (2010). Ethanol and PTZ effects on siRNA-mediated GABAB1 receptor: down regulation of intracellular signaling pathway in prenatal rat cortical and hippocampal neurons. *Synapse.* **64**, 181-90.

- Nebigil C.G., Etienne N., Schaerlinger B., Hickel P., Launay J.M. et Maroteaux L.** (2001). Developmentally regulated serotonin 5-HT_{2B} receptors. *Int J Dev Neurosci.* **19**, 365-72.
- Nehlig A. et Coles J.A.** (2007). Cellular pathways of energy metabolism in the brain: is glucose used by neurons or astrocytes? *Glia.* **55**, 1238-50.
- Neumann P.E. et Seyfried T.N.** (1990). Mapping of two genes that influence susceptibility to audiogenic seizures in crosses of C57BL/6J and DBA/2J mice. *Behav Genet.* **20**, 307-23.
- Newgard C.B., Brady M.J., O'Doherty R.M. et Saltiel A.R.** (2000). Organizing glucose disposal: emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1. *Diabetes.* **49**, 1967-77.
- Nicoll R.A., Tomita S. et Brecht D.S.** (2006). Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science.* **311**, 1253-6.
- Nowak G., Ordway G.A. et Paul I.A.** (1995). Alterations in the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex in the frontal cortex of suicide victims. *Brain Res* **675**, 157-64.
- Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A. et Prochiantz A.** (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature.* **307**, 462-5.
- Olsen R.W. et Sieghart W.** (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev.* **60**, 243-60.
- Orlowski M. et Wilk S.** (1975). In vivo inhibition of gamma-glutamylcysteine synthetase by L-methionine-RS-sulfoximine; influence on intermediates of the gamma-glutamyl cycle. *J Neurochem.* **25**, 601-6.
- Ortiz J.G., Negrón A.E., García M.T., Rosado J.E. et Maldonado C.S.** (1990). The C57BL/10Bg sps/sps mouse: a mutant with absence-like seizures; neurochemical and behavioral correlates. *Neurosci Lett.* **114**, 231-6.
- Park H.G., Yoon S.Y., Choi J.Y., Lee G.S., Choi J.H., Shin C.Y., Son K.H., Lee Y.S., Kim W.K., Ryu J.H. et al.** (2007). Anticonvulsant effect of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Eur J Pharmacol.* **274**, 112-9.
- Parpura V. et Zorec R.** (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev.* **63**, 83-92.
- Patsalos P.N.** (2005). Properties of antiepileptic drugs in the treatment of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia* **46**, 140-8.
- Paul C.M., Magda G. et Abel S.** (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res.* **203**, 151-64.
- Pekhletski R., Gerlai R., Overstreet L.S., Huang X.P., Agopyan N., Slater N.T., Abramow-Newerly W., Roder J.C. et Hampson D.R.** (1996). Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J Neurosci.* **16**, 6364-73.
- Pellegrini G., Rossier C., Magistretti P.J. et Martin J.L.** (1996). Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase. *Brain Res Mol Brain Res.* **38**, 191-9.

- Peng L., Li B., Du T., Kong E.K., Hu X., Zhang S., Shan X. et Zhang M.** (2010). Astrocytic transactivation by alpha2A-adrenergic and 5-HT2B serotonergic signaling. *Neurochem Int.* **57**, 421-31.
- Perkinton M.S., Sihra T.S. et Williams R.J.** (1999). Ca²⁺-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *J Neurosci.* **19**, 5861-74.
- Perrais D., Veran J. et Mulle C.** (2010). Gating and permeation of kainate receptors: differences unveiled. *Trends Pharmacol Sci.* **31**, 516-22.
- Perreault M.L., O'Dowd B.F. et George S.R.** (2011). Dopamine receptor homooligomers and heterooligomers in schizophrenia. *CNS Neurosci Ther.* **17**, 52-7.
- Pfrieger F.W. et Steinmetz C.** (2003). Les astrocytes, nouvelles stars du cerveau. *La Recherche* **361**, 50-54.
- Phelps C.H.** (1975). An ultrastructural study of methionine sulphoximine-induced glycogen accumulation in astrocytes of the mouse cerebral cortex. *J Neurocytol.* **4**, 479-90.
- Picard M., Cloix J.F. et Hevor T.K.** (2011). Serotonergic neurotransmission plays a major role in the action of the glyco-genic convulsant methionine sulfoximine. *Neurosci Res.* **70**, 313-20.
- Pillai J.J.** (2010). Insights into adult postlesional language cortical plasticity provided by cerebral blood oxygen level-dependent functional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* **31**, 990-6.
- Pinel J.P. et Rovner L.I.** (1978). Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. *Exp Neurol.* **58**, 190-202.
- Pláteník J., Kuramoto N. et Yoneda Y.** (2000). Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci.* **67**, 335-64.
- Poitry S., Poitry-Yamate C., Ueberfeld J., MacLeish P.R. et Tsacopoulos M.** (2000). Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci.* **20**, 1809-21.
- Popa D., Léna C., Fabre V., Prenat C., Gingrich J., Escourrou P., Hamon M. et Adrien J.** (2005). Contribution of 5-HT2 receptor subtypes to sleep-wakefulness and respiratory control, and functional adaptations in knock-out mice lacking 5-HT2A receptors. *J Neurosci.* **25**, 11231-8.
- Popova N.K. et Amstislavskaya T.G.** (2002). 5-HT2A and 5-HT2C serotonin receptors differentially modulate mouse sexual arousal and the hypothalamo-pituitary-testicular response to the presence of a female. *Neuroendocrinology.* **76**, 28-34.
- Pow D.V., Barnett N.L. et Penfold P.** (2000). Are neuronal transporters relevant in retinal glutamate homeostasis? *Neurochem Int.* **37**, 191-8.
- Pratt M.R. et Bertozzi C.R.** (2004). Synthetic glycopeptides and glycoproteins as tools for biology. *Chem Soc Rev.* **34**, 58-68.
- Prut L. et Belzung C.** (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* **463**, 3-33.

- Pucadyil T.J., Kalipatnapu S. et Chattopadhyay A.** (2005). The serotonin_{1A} receptor: a representative member of the serotonin receptor family. *Cell Mol Neurobiol.* **25**, 553-80.
- Pullar I.A., Boot J.R., Broadmore R.J., Eyre T.A., Cooper J., Sanger G.J., Wedley S. et Mitchell S.N.** (2004). The role of the 5-HT_{1D} receptor as a presynaptic autoreceptor in the guinea pig. *Eur J Pharmacol.* **493**, 85-93.
- Québard C., Bourgerie S., Normand-Sdioui N., Mayer R., Strecker G., Midoux P., Roche A.C. et Monsigny M.** (1998). Novel glycosynthons for glycoconjugate preparation: oligosaccharylpyroglutamylanilide derivatives. *Bioconjug Chem.* **9**, 268-76.
- Racine R.J.** (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* **32**, 281-94.
- Rae C., Hare N., Bubb W.A., McEwan S.R., Bröer A., McQuillan J.A., Balcar V.J., Conigrave A.D. et Bröer S.** (2003). Inhibition of glutamine transport depletes glutamate and GABA neurotransmitter pools: further evidence for metabolic compartmentation. *J Neurochem.* **85**, 503-14.
- Rees M.I.** (2010). The genetics of epilepsy-the past, the present and future. *Seizure* **19**, 680-3.
- Reilly M.T., Milner L.C., Shirley R.L., Crabbe J.C. et Buck K.J.** (2008). 5-HT_{2C} and GABAB receptors influence handling-induced convulsion severity in chromosome 4 congenic and DBA/2J background strain mice. *Brain Res.* **1198**, 124-31.
- Rice C.D., Lois J.H., Kerman I.A. et Yates B.J.** (2009). Localization of serotonergic neurons that participate in regulating diaphragm activity in the cat. *Brain Res.* **1279**, 71-81.
- Richerson G.B. et Buchanan G.F.** (2011). The serotonin axis: Shared mechanisms in seizures, depression, and SUDEP. *Epilepsia.* **52**, 28-38.
- Riley J.D., Franklin D.L., Choi V., Kim R.C., Binder D.K., Cramer S.C. et Lin J.J.** (2010). Altered white matter integrity in temporal lobe epilepsy: association with cognitive and clinical profiles. *Epilepsia* **51**, 536-45.
- Rodgers R.J., Cao B.J., Dalvi A. et Holmes A.** (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* **30**, 289-304.
- Rodrigo R. et Felipe V.** (2007). Control of brain glutamine synthesis by NMDA receptors. *Front Biosci.* **12**, 883-90.
- Ronzio R.A., Rowe W.B. et Meister A.** (1969). Studies on the mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. *Biochemistry.* **8**, 1066-75.
- Rosell A., Arai K., Lok J., He T., Guo S., Navarro M., Montaner J., Katusic Z.S. et Lo E.H.** (2009). Interleukin-1 β augments angiogenic responses of murine endothelial progenitor cells in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* **29**, 933-43.
- Rosenmund C., Stern-Bach Y. et Stevens C.F.** (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science.* **280**, 1596-9.
- Rothstein J.D. et Tabakoff B.** (1982). Effects of the convulsant methionine sulfoximine on striatal dopamine metabolism. *J Neurochem.* **39**, 452-7.
- Rowe W.B. et Meister A.** (1970). Identification of L-methionine-S-sulfoximine as the convulsant isomer of methionine sulfoximine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **66**, 500-6.

- Rubio-Aliaga I., Boll M., Vogt Weisenhorn D.M., Foltz M., Kottra G. et Daniel H.** (2004). The proton/amino acid cotransporter PAT2 is expressed in neurons with a different subcellular localization than its paralog PAT1. *J Biol Chem.* **279**, 2754-60.
- Rudd P.M., Wormald M.R. et Dwek R.A.** (2004). Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system. *Trends Biotechnol.* **22**, 524-30.
- Rüdiger H. et Gabius H.J.** (2001). Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj J.* **18**, 589-613.
- Sacktor B., Wilson J.E. et Tiekert C.G.** (1966). Regulation of glycolysis in brain, in situ, during convulsions. *J Biol Chem.* **241**, 5071-5.
- Sailer A., Swanson G.T., Pérez-Otaño I., O'Leary L., Malkmus S.A., Dyck R.H., Dickinson-Anson H., Schiffer H.H., Maron C., Yaksh T.L. et al.** (1999). Generation and analysis of GluR5(Q636R) kainate receptor mutant mice. *J Neurosci.* **19**, 8757-64.
- Salter M.W., Dong Y., Kalia L.V., Liu X.J. et Pitcher G.** (2009). Regulation of NMDA Receptors by Kinases and Phosphatases. *In: Biology of the NMDA Receptor. (CRC Press) Chapter 7.*
- Samuels S., Fish I. et Freedman L.S.** (1978). Effect of gamma-glutamyl cycle inhibitors on brain amino acid transport and utilization. *Neurochem Res.* **3**, 619-31.
- Sadow N., Zahn R.K., Gabriel S., Heinemann U. et Lehmann T.N.** (2009). Glutamine induces epileptiform discharges in superficial layers of the medial entorhinal cortex from pilocarpine-treated chronic epileptic rats in vitro. *Epilepsia.* **50**, 849-58.
- Schank J.R., Liles L.C. et Weinshenker D.** (2005). Reduced anticonvulsant efficacy of valproic acid in dopamine beta-hydroxylase knockout mice. *Epilepsy Res.* **65**, 23-31.
- Schliess F., Görg B., Fischer R., Desjardins P., Bidmon H.J., Herrmann A., Butterworth R.F., Zilles K. et Häussinger D.** (2002). Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J.* **16**, 739-41.
- Schorge S. et Colquhoun D.** (2003). Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci.* **23**, 1151-8.
- Schousboe A.** (2003). Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Res.* **28**, 347-52.
- Schwegler H. et Crusio W.E.** (1995). Correlations between radial-maze learning and structural variations of septum and hippocampus in rodents. *Behav Brain Res.* **67**, 29-41.
- Schwegler H., Crusio W.E. et Brust I.** (1990). Hippocampal mossy fibers and radial-maze learning in the mouse: a correlation with spatial working memory but not with non-spatial reference memory. *Neuroscience* **34**, 293-8.
- Seeberger P.H. et Werz D.B.** (2007). Synthesis and medical applications of oligosaccharides. *Nature.* **446**, 1046-51.
- Sharabi Y., Imrich R., Holmes C., Pechnik S. et Goldstein D.S.** (2008). Generalized and neurotransmitter-selective noradrenergic denervation in Parkinson's disease with orthostatic hypotension. *Mov Disord.* **23**, 1725-32.
- Sharma S., Rakoczy S. et Brown-Borg H.** (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.* **87**, 521-36.

- Shirasawa N. et Yamanouchi H.** (1999). Glucocorticoids induce glutamine synthetase in folliculostellate cells of rat pituitary glands in vivo and in vitro. *J Anat.* **194**, 597-77.
- Sidoryk-Wegrzynowicz M., Lee E., Albrecht J. et Aschner M.** (2009). Manganese disrupts astrocyte glutamine transporter expression and function. *J Neurochem.* **110**, 822-30.
- Simonyi A., Schachtman T.R. et Christoffersen G.R.** (2005). The role of metabotropic glutamate receptor 5 in learning and memory processes. *Drug News Perspect.* **18**, 353-61.
- Singh S. et Ganesh S.** (2009). Lafora progressive myoclonus epilepsy: a meta-analysis of reported mutations in the first decade following the discovery of the EPM2A and NHLRC1 genes. *Hum Mutat.* **30**, 715-23.
- Smith G.B. et Olsen R.W.** (1995). Functional domains of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* **16**, 162-8.
- Somers D.L. et Beckstead R.M.** (1990). Chronic methionine sulfoximine administration reduces synaptosomal aspartate and glutamate in rat striatum. *Neurosci Lett.* **115**, 335-40.
- Sprengel R.** (2006). Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell Tissue Res.* **326**, 447-55.
- Starr M.S.** (1996). The role of dopamine in epilepsy. *Synapse.* **22**, 159-94.
- Stefulj J., Bordukalo-Niksic T., Hecimovic H., Demarin V. et Jernej B.** (2010). Epilepsy and serotonin (5HT): variations of 5HT-related genes in temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett.* **478**, 29-31.
- Storck T., Schulte S., Hofmann K. et Stoffel W.** (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 10955-9.
- Subbalakshmi G.Y. et Murthy C.R.** (1983). Effects of methionine sulfoximine on the enzymes of glutamate metabolism in isolated astrocytes of rat brain. *Biochem Pharmacol.* **32**, 3695-700.
- Sumner J.B., Howell S.F. et Zeissig A.** (1935). ConcanavalinA and hemagglutination. *Science.* **82**, 65-66.
- Swanson R.A., Yu A.C., Sharp F.R. et Chan P.H.** (1989). Regulation of glycogen content in primary astrocyte culture: effects of glucose analogues, phenobarbital, and methionine sulfoximine. *J Neurochem.* **52**, 1359-65.
- Szabó C.A., Lancaster J.L., Lee S., Xiong J.H., Cook C., Mayes B.N. et Fox P.T.** (2006). MR imaging volumetry of subcortical structures and cerebellar hemispheres in temporal lobe epilepsy. *AJNR Am J Neuroradiol.* **27**, 2155-60.
- Takuma K., Baba A. et Matsuda T.** (2004). Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* **72**, 111-27.
- Tani H., Dulla C.G., Huguenard J.R. et Reimer R.J.** (2010). Glutamine is required for persistent epileptiform activity in the disinhibited neocortical brain slice. *J Neurosci.* **30**, 1288-300.
- Tao S.C., Li Y., Zhou J., Qian J., Schnaar R.L., Zhang Y., Goldstein I.J., Zhu H. et Schneck J.P.** (2008). Lectin microarrays identify cell-specific and functionally significant cell surface glycan markers. *Glycobiology.* **18**, 761-9.

- Thompson A.J. et Lummis S.C.** (2006). 5-HT₃ receptors. *Curr Pharm Des.* **12**, 3615-30.
- Traynelis S.F. et Wahl P.** (1997). Control of rat GluR6 glutamate receptor open probability by protein kinase A and calcineurin. *J Physiol.* **503**, 513-1.
- Tripathi P.P., Di Giovannantonio L.G., Viegi A., Wurst W., Simeone A. et Bozzi Y.** (2008). Serotonin hyperinnervation abolishes seizure susceptibility in Otx2 conditional mutant mice. *J Neurosci.* **28**, 9271-6.
- Tsuji Y., Shimada Y., Takeshita T., Kajimura N., Nomura S., Sekiyama N., Otomo J., Usukura J., Nakanishi S. et Jingami H.** (2000). Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J Biol Chem.* **275**, 28144-51.
- Unwin N.** (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol.* **346**, 967-89.
- van den Berg C.J. et Garfinkel D.** (1971). A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem J.* **123**, 211-8.
- van Echten-Deckert G. et Gurgui M.** (2008). Golgi localization of glycosyltransferases involved in ganglioside biosynthesis. *Curr Drug Targets.* **9**, 282-91.
- VanCott A.C., Cramer J.A., Copeland L.A., Zeber J.E., Steinman M.A., Dersh J.J., Glickman M.E., Mortensen E.M., Amuan M.E. et Pugh M.J.** (2010). Suicide-related behaviors in older patients with new anti-epileptic drug use: data from the VA hospital system. *BMC Med.* **8**, 4.
- VanDongen A.M., VanErp M.G. et Voskuyl RA.** (1986). Valproate reduces excitability by blockage of sodium and potassium conductance. *Epilepsia.* **27**, 177-82.
- Vanhoutte P. et Bading H.** (2003). Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Curr Opin Neurobiol.* **13**, 366-71.
- Varoqui H., Zhu H., Yao D., Ming H. et Erickson J.D.** (2000). Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *J Biol Chem.* **275**, 4049-54.
- Venault P. et Chapouthier G.** (2007). From the behavioral pharmacology of beta-carbolines to seizures, anxiety, and memory. *ScientificWorldJournal.* **7**, 204-23.
- Vergé V. et Hevor T.K.** (1995). Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase activity in primary cultured astrocytes. *Neurochem Res.* **20**, 1049-56.
- Wakamoto H., Chugani D.C., Juhász C., Muzik O., Kupsky W.J. et Chugani H.T.** (2008). Alpha-Methyl-l-Tryptophan Positron Emission Tomography in Epilepsy With Cortical Developmental Malformations. *Pediatric Neurology* **39**, 181-188.
- Wang J.K., Andrews H. et Thukral V.** (1992). Presynaptic glutamate receptors regulate noradrenaline release from isolated nerve terminals. *J Neurochem.* **58**, 204-11.
- Wang S.C., Shih H.H., Rossi R.T. et Campbell W.** (2007a). Determination of highly polar catecholamine with liquid chromatography–tandem mass spectrometry using weak cation-exchange stationary phase to increase retention time. *Microchem. J.* **87**, 163-9.
- Wang Z., Pandey A. et Hart G.W.** (2007b). Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol Cell Proteomics.* **6**, 1365-79.

- Watanabe A., Fukutomi K., Kubo H., Ohta M., Takayama-Watanabe E. et Onitake K.** (2009). Identification of egg-jelly substances triggering sperm acrosome reaction in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Mol Reprod Dev.* **76**, 399-406.
- Welsh J.P., Placantonakis D.G., Warsetsky S.I., Marquez R.G., Bernstein L. et Aicher S.A.** (2002). The serotonin hypothesis of myoclonus from the perspective of neuronal rhythmicity. *Adv Neurol.* **89**, 307-29.
- Wendling F., Bartolomei F. et Senhadji L.** (2009). Spatial analysis of intracerebral electroencephalographic signals in the time and frequency domain: identification of epileptogenic networks in partial epilepsy. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* **367**, 297-316.
- Wesolowska A.** (2002). In the search for selective ligands of 5-HT₅, 5-HT₆ and 5-HT₇ serotonin receptors. *Pol J Pharmacol.* **54**, 327-41.
- Wesolowska A.** (2010). Potential role of the 5-HT₆ receptor in depression and anxiety: an overview of preclinical data. *Pharmacol Rep.* **62**, 564-77.
- Wieronska J.M. et Pile A.** (2009). Metabotropic glutamate receptors in the tripartite synapse as a target for new psychotropic drugs. *Neurochem Int.* **55**, 85-97.
- Wiesinger H., Hamprecht B. et Dringen R.** (1997). Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* **21**, 22-34.
- Winawer M.R., Makarenko N., McCloskey D.P., Hintz T.M., Nair N., Palmer A.A. et Scharfman H.E.** (2007). Acute and chronic responses to the convulsant pilocarpine in DBA/2J and A/J mice. *Neuroscience* **149**, 465-75.
- Wittkowski W.** (1998). Tanycytes and pituicytes: morphological and functional aspects of neuroglial interaction. *Microsc Res Tech.* **41**, 29-42.
- Wo Z.G. et Oswald R.E.** (1994). Transmembrane topology of two kainate receptor subunits revealed by N-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 7154-8.
- Yudkoff M., Daikhin Y., Grunstein L., Nissim I., Stern J., Pleasure D. et Nissim I.** (1996). Astrocyte leucine metabolism: significance of branched-chain amino acid transamination. *J Neurochem.* **66**, 378-85.
- Yuen E.Y., Jiang Q., Chen P., Gu Z., Feng J. et Yan Z.** (2005). Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *J Neurosci.* **25**, 5488-501.
- Yuzaki M.** (2011). Cbln1 and its family proteins in synapse formation and maintenance. *Curr Opin Neurobiol.* **21**, 215-20.
- Zahr N.M., Crawford E.L., Hsu O., Vinco S., Mayer D., Rohlfing T., Sullivan EV. et Pfefferbaum A.** (2009). In vivo glutamate decline associated with kainic acid-induced status epilepticus. *Brain Res.* **1300**, 65-78.
- Zhao M., Suh M., Ma H., Perry C., Geneslaw A. et Schwartz T.H.** (2007). Focal increases in perfusion and decreases in hemoglobin oxygenation precede seizure onset in spontaneous human epilepsy. *Epilepsia* **48**, 2059-2067.
- Zheng F., Erreger K., Low C.M., Banke T., Lee C.J., Conn P.J. et Traynelis S.F.** (2001). Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. *Nat Neurosci.* **4**, 894-901.

Zhou L., Wang W., Wang S., Hui Y., Luo Z. et Hu Z. (2008). Nonaqueous capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: a case study of comparison with aqueous media. *Anal Chim Acta.* **611**, 212-9.

Zhu Y.Y., Zhu-Ge Z.B., Wu D.C., Wang S., Liu L.Y., Ohtsu H. et Chen Z. (2007). Carnosine inhibits pentylentetrazol-induced seizures by histaminergic mechanisms in histidine decarboxylase knock-out mice. *Neurosci Lett.* **416**, 211-6.

Zilles K., Wu J., Crusio W.E. et Schwegler H. (2000). Water maze and radial maze learning and the density of binding sites of glutamate, GABA, and serotonin receptors in the hippocampus of inbred mouse strains. *Hippocampus.* **10**, 213-25.

Zoerner A.A., Heusser K., Gutzki F.M., Mitschke A., J. Tank., Stichtenoth D.O., Jordan J. et Tsikas D. (2011). Unique pentafluorobenzoylation and collision-induced dissociation for specific and accurate GC-MS/MS quantification of the catecholamine metabolite 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **879**, 1444-56.

Zou J., Wang Y.X., Dou F.F., Lü H.Z., Ma Z.W., Lu P.H. et Xu X.M. (2010). Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochem Int.* **56**, 577-84.

Zwingmann C., Richter-Landsberg C., Brand A. et Leibfritz D. (2000). NMR spectroscopic study on the metabolic fate of [3-(13)C]alanine in astrocytes, neurons, and cocultures: implications for glia-neuron interactions in neurotransmitter metabolism. *Glia.* **32**, 286-303.

Arnaud BOISSONNET

Étude de deux lignées de souris sélectionnées pour leur différence de réponse à la méthionine sulfoximine

Résumé :

Certaines formes d'épilepsies nécessitent encore d'être étudiées pour pouvoir être traitées. Le modèle d'animaux épileptiques développé par le Laboratoire de Neurobiologie est constitué des lignées MSO-Fast et MSO-Slow, convulsant respectivement rapidement ou tardivement après l'injection de méthionine sulfoximine (MSO). Ce travail a pour but d'analyser et de comparer ces deux lignées afin de mieux comprendre les mécanismes contribuant à l'apparition des crises induites par la MSO. Les deux lignées ont d'abord été caractérisées par leurs réponses à la MSO. L'implication de la voie glutamatergique a ensuite été mise en évidence par l'administration de convulsivants et d'anticonvulsivants ainsi que par une étude de l'anxiété et de la faculté d'apprentissage. L'étude de la glutamine synthétase, enzyme-clé du recyclage du glutamate en tant que neurotransmetteur, a révélé une plus faible activité de cette enzyme pour la lignée MSO-Fast. La mesure de la variation du taux de glycogène astrocytaire indique que le métabolisme glucidique, lié étroitement à la voie glutamatergique, participe à la différence de sensibilité entre les deux lignées. Une étude complémentaire de la glycosylation des protéines a révélé une modification de la N-glycosylation induite par une dose convulsivante de MSO. Les concentrations de 13 molécules appartenant à la famille des monoamines ont été mesurées par HPLC. Cette étude démontre d'une part la forte diminution de tryptophane et de tyrosine après injection de MSO et d'autre part l'implication de la noradrénaline et de la sérotonine, les deux principaux neurotransmetteurs contrôlant la quantité de glycogène astrocytaire.

Mots clés : épilepsie, méthionine sulfoximine, glutamate, métabolisme glucidique, neurotransmission monoaminergique, glycosylation

Study of two lines of mice selected for their different responses to methionine sulfoximine

Summary:

Certain forms of epilepsies still require understanding their mechanisms to be treated. The model of epileptic animals developed by the Laboratory of Neurobiology is constituted by the lines MSO-Fast and MSO-Slow, convulsing respectively quickly or late after the injection of methionine sulfoximine (MSO). This work aims at analyzing and at comparing these two lines to better understand mechanisms contributing to the appearance of the crises induced by MSO. Both lines were characterized at first by their answers to MSO. The implication of the glutamatergic neurotransmission was then revealed by the administration of convulsants and anticonvulsants as well as by a study of the anxiety and the faculty of learning. The study of the glutamine synthetase, the key-enzyme of the neurotransmitter glutamate recycling, revealed a lower activity of this enzyme for the line MSO-Fast. The measure of the variation of astrocyte glycogen indicates that the glucidic metabolism, connected to the glutamatergic pathway, participates to the difference of sensibility between both lines. The study of the glycoproteins revealed a modification of N-glycosylation linked to a convulsant dose of MSO. The concentrations of 13 molecules belonging to the family of monoamines were measured by HPLC. This study demonstrates on one hand the strong decrease of tryptophane and tyrosine after injection of MSO and on the other hand the implication of norepinephrine and serotonin, two main neurotransmitters controlling the quantity of astrocyte glycogen.

Keywords: epilepsy, methionine sulfoximine, glutamate, glucidic metabolism, monoaminergic neurotransmission, glycosylation



Laboratoire de Neurobiologie

Université d'Orléans
Rue de Chartres
45067 ORLEANS CEDEX

GLYcoDiag

520 rue de Chanteloup
45520 CHEVILLY

