



HAL
open science

Propriétés fonctionnelles des réseaux et des neurones corticaux chez l'homme et l'animal atteints d'épilepsie-absence : études électrophysiologiques in vivo

Mathilde Chipaux

► To cite this version:

Mathilde Chipaux. Propriétés fonctionnelles des réseaux et des neurones corticaux chez l'homme et l'animal atteints d'épilepsie-absence : études électrophysiologiques in vivo. Neurobiologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66498 . tel-00828262

HAL Id: tel-00828262

<https://theses.hal.science/tel-00828262>

Submitted on 30 May 2013

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.



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
Ecole doctorale Cerveau Cognition Comportement
Spécialité Neurosciences

Présentée par

Mathilde CHIPAUX

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Propriétés fonctionnelles des réseaux et des
neurones corticaux chez l'homme et l'animal atteints
d'épilepsie-absence :
Etudes électrophysiologiques in vivo**

Soutenue le 14 novembre 2012

Devant le jury composé de :

Pr Stéphane CHARPIER
Dr Rustem KHAZIPOV
Pr Emmanuel RAFFO
Dr Rima NABBOUT
Dr Antoine DEPAULIS
Pr Régis LAMBERT

Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Remerciements

A Stéphane Charpier, qui a accepté de m'accueillir dans son équipe et de faire confiance à un médecin souhaitant approcher le monde des neurosciences fondamentales. Les échanges entre nos deux disciplines ont été très enrichissants pour moi. Je n'aurais certainement pas pu mener à bien mon projet de thèse sans son aide précieuse.

A l'équipe de la Fondation Rothschild et en particulier à Olivier Delalande et Delphine Taussig, qui m'ont accueillie dans leur équipe au milieu de ma thèse, en acceptant que je réduise mon temps de travail pendant les 2 premières années pour finir ce projet.

A Boris Zalc, qui m'a permis de travailler au sein du Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière.

A Gilles Huberfeld, ma porte d'entrée vers les neurosciences et l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière.

A Séverine Mahon, pierre angulaire du laboratoire, pour son aide dans l'apprentissage de l'électrophysiologie, de l'analyse des données à la rédaction.

A Morgane Pidoux, aide indispensable pour faire connaissance avec la chasse aux neurones et leur analyse complexe. Merci de m'avoir donné de ton temps quand j'arrivais dans le monde de l'électrophysiologie.

A Dominique Rosenberg, pour sa relecture attentive et son amitié.

A Catalina Alvarado, qui m'a sortie de plusieurs situations informatiques difficiles.

Et à tous les autres que je ne cite pas, mais qui sont dans mon cœur.

Aux Membres du Jury, pour me faire l'honneur de participer au jury de ce travail :

A Régis Lambert, qui a accepté de présider ce jury et m'a dispensé quelques idées très utiles lors de notre brève rencontre en début de thèse.

A Rustem Khazipov, qui m'a encadré lors de mon master et accueilli à l'INMED pour mes premiers pas en neurosciences en 2006. Ce fut mon premier contact avec l'enregistrement des neurones.

A Antoine Depaulis, qui m'a fourni les rats GAERS, magnifique lignée de rats spontanément épileptiques, sans lesquels rien n'existerait dans ce travail. La collaboration entre nos 2 laboratoires au cours de ce travail de thèse a été source de diversification et d'enrichissement pour moi.

A Rima Nabbout, qui m'a accueillie au sein du Centre de Référence des Epilepsies Rares à l'Hôpital Necker Enfants Malades en 2006 pour poursuivre ma formation en épileptologie pédiatrique.

A Emmanuel Raffo, mon mentor, rencontré dès le début de mon internat à Nancy en 1999, sans qui je ne serais pas entrée dans le monde de l'épileptologie pédiatrique.

Sommaire

Résumé	7
Abréviations	9
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	11
Chapitre 1-1 : Introduction générale et présentation de la thèse	11
Chapitre 1-2 : Epilepsie-absence typique de l'enfant	14
1. Historique	14
2. Epidémiologie	15
3. Clinique	16
4. EEG	17
5. Imagerie	19
6. Etiologie	20
7. Pronostic de l'épilepsie	20
8. Pronostic cognitif	21
9. Hypothèse expliquant la rupture contact	23
10. Traitements	24
11. Autres syndromes épileptiques avec crises d'absence	25
Chapitre 1-3 : Présentation de la boucle thalamo-corticale	30
1. Thalamus	30
2. Cortex	37
3. Organisation du système thalamo-cortical	42
Chapitre 1-4 : Organisation anatomo-fonctionnelle du système des vibrisses	44
1. Ganglion trigéminal	44
2. Tronc cérébral	45
3. Thalamus	45
4. Cortex	47
Chapitre 1-5 : Modèles animaux génétiques	50
1. Intérêt/ homologie des modèles animaux	50
2. Le rat WAG/Rij	51
3. Les modèles murins	53
4. Le modèle animal choisi dans nos travaux : le GAERS	54
Chapitre 1-6 : Origine des crises d'absence	58
1. Historique: de l'hypothèse « centrencéphalique » au thalamus	59
2. Vers un consensus cortical ?	61
3. Rôle du thalamus dans la « théorie corticale » : maintien des oscillations paroxystiques	69
4. Conclusions	71
Chapitre 1-7: Stratégie expérimentale et Objectifs	72

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	75
1. Méthodologie chez l'animal	75
2. Méthodologie chez l'homme	80
CHAPITRE 3 : RESULTATS	83
Chapitre 3-1: Persistence du traitement sensoriel cortical durant les crises d'absence : Etude électrophysiologique multi-espèces et multi-échelles	83
Article 1: Persistence of cortical sensory Processing during Absence Seizures: Evidence from électroencéphalographic and Intracellular Recordings in Human and an animal model	
Chapitre 3-2: Inhibition chlore-dépendante des neurones pyramidaux corticaux initiant les crises d'absence chez le GAERS	115
Article 2: Chloride-mediated inhibition of the ictogenic neurones initiating genetically-determined absence seizures.	
CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE	129
1. Vers un schéma physiopathologique des crises d'absence : rôle de l'inhibition	129
2. Crises d'absence et intégration sensorielle	133
3. L'épilepsie-absence, une épilepsie généralisée idiopathique ?	137
4. Aspects maturationnels du foyer ictogénique	141
Annexe 1 : Article de collaboration avec l'équipe d'Antoine Depaulis	143
L'irradiation focale par rayons X réduit les décharges de pointes-ondes : Synchrotron x-ray microbeams suppress paroxysmal oscillations in neurons and cortical networks that initiate generalized epilepsy.	
Annexe 2 : Article de synthèse	161
Physiopathologie de l'épilepsie-absence : Les avancées récentes	
Références bibliographiques	167

Résumé

L'épilepsie-absence est un syndrome épileptique débutant dans l'enfance dont le principal symptôme est une altération transitoire de la conscience, se traduisant notamment par une interruption des perceptions sensorielles. Les crises d'absence sont associées dans l'électroencéphalogramme (EEG) : de surface à des décharges pointes-ondes (DPO) généralisées. Il est reconnu de longue date que les DPO ont pour origine un dysfonctionnement dans la boucle cortico-thalamique, mais leur site de déclenchement a été longtemps controversé. De récentes données électrophysiologiques, et métaboliques cérébrales, obtenues chez l'homme et dans divers modèles animaux d'épilepsie-absence, indiquent que les paroxysmes épileptiques prennent naissance dans des régions restreintes du cortex cérébral. En particulier, les DPO chez les Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) émergent à partir d'une sous-population de neurones pyramidaux localisée dans les couches profondes du cortex somatosensoriel.

Au cours de mes recherches doctorales, j'ai abordé deux questions fondamentales, et irrésolues jusqu'alors, concernant : 1/ le rôle de l'inhibition corticale dans les processus ictogéniques des absences et, 2/ les mécanismes neurophysiologiques sous-tendant le traitement sensoriel au cours des crises.

A l'aide d'enregistrements EEG et intracellulaires couplés chez les GAERS *in vivo*, j'ai examiné comment l'inhibition GABAergique, chlore-dépendante, participe aux activités ictogéniques des neurones pyramidaux du cortex somatosensoriel. J'ai montré que l'excitation initiale de ces neurones lors des crises était suivie par une hyperpolarisation synaptique chlore-dépendante, dont le potentiel d'inversion ne semblait pas être altéré comparé à la situation physiologique. Cette inhibition était concomitante d'une décharge en bouffées dans les interneurons GABAergiques locaux. Ainsi, il apparaît que, contrairement à d'autres formes d'épilepsie, le système GABAergique exerce un effet strictement inhibiteur ayant pour conséquence de contraindre la décharge des neurones ictogéniques dans une fenêtre temporelle étroite.

Dans une deuxième étude translationnelle, réalisée en parallèle chez l'homme et le GAERS, j'ai exploré comment des informations sensorielles, pertinentes pour chacune de ces deux espèces, étaient traitées au cours des DPO dans les régions corticales correspondantes. Chez l'enfant épileptique, des stimulations visuelles répétées résultaient en des potentiels évoqués occipitaux, dont l'amplitude était significativement amplifiée comparé aux sujets non-épileptiques. De manière cohérente, des stimulations tactiles chez le GAERS induisaient lors des crises des potentiels évoqués somatosensoriels, lesquels étaient sous-tendus dans les neurones pyramidaux sous-jacents par des potentiels synaptiques excitateurs d'amplitude accrue, comparés à la condition inter-critique. Ces résultats suggèrent que les troubles de la conscience lors des absences ne résultent pas d'un filtrage des informations sensorielles se propageant vers le cortex mais probablement d'une altération des dynamiques cérébrales à grande échelle.

L'ensemble de ces recherches fournit des données nouvelles et inattendues sur les propriétés fonctionnelles des circuits corticaux exprimant les paroxysmes électriques lors des crises d'absence.

Summary

Absence epilepsy is an epileptic syndrome starting during childhood. Its main symptom is a transient alteration of consciousness, which is mainly expressed as an interruption of sensory interaction. Absence seizures are associated in the surface electroencephalogram (EEG) with generalized spike-and-wave discharges (SWDs). Although it has long been recognized that SWDs arise from a dysfunction in the corticothalamic loop, their site of initiation has been the matter of intense debate. Recent electrophysiological and brain imaging investigations, obtained in human and various animal models of absence epilepsy, indicate that epileptic paroxysms originate from discrete areas of the cerebral cortex. In particular, SWDs in the Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) are initiated from a subclass of pyramidal neurons located in the deep layers of the somatosensory cortex.

During my PhD researches, I have investigated two fundamental, and unresolved, issues relative to: 1/ the role of the cortical inhibition in the ictogenic processes and, 2/ the neurophysiological mechanisms of sensory processing during absence seizures.

By the means of simultaneous EEG and intracellular recordings *in vivo* from the GAERS, I have examined how the chloride-dependent GABAergic inhibition participates in the ictogenic activities of the somatosensory cortex pyramidal neurons. I found that the early excitation in these neurons during seizures was shortly followed by a chloride-dependent synaptic hyperpolarization, whose reversal potential seemed unchanged compared to the physiological condition. This inhibition was concomitant with bursting activities in local GABAergic interneurons. Thus, in contrast with other forms of epilepsy, the GABAergic system has an active inhibitory effect, which constrains the firing of ictogenic neurons within a tight temporal window.

In a second translational study, performed in parallel in human and GAERS, I explored how sensory information, functionally pertinent for both species, was processed during SWDs in the related cortical regions. In the epileptic child, repeated visual stimulations resulted in occipital evoked potentials, with an amplitude that was significantly increased compared to non-epileptic subjects. Consistently, tactile stimulation of the GAERS applied during seizures induced somatosensory cortical evoked potentials, which were reflected in the related pyramidal neurons by excitatory synaptic potentials having an augmented magnitude compared to interictal condition. These results suggest that impairment of consciousness during absences do not result from a filtering of sensory information propagating towards the cortex but from a transient alteration of large-scale brain dynamics.

Altogether, these researches provide new and unexpected information on the functional properties of the cortical circuits expressing the electrical paroxysms during absence seizures.

Abréviations

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone propionate
DPO : décharge de pointes-ondes
ECoG : électrocorticogramme
EEG : électroencéphalogramme
GABA : acide γ -aminobutyrique
GABA_A : récepteur GABAergique de type A
GABA_B : récepteur GABAergique de type B
GAERS: Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg
GAT-1: GABA transporteur 1
Glu : Glutamate
I_h : courant cationique non sélectif activé par l'hyperpolarisation
ILAE : International League Against Epilepsy
i.m. : intramusculaire
i.p. : intrapéritonéal
IRM : Imagerie par résonance magnétique
IRMf : Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
I_T : courant calcique de type T dit à bas seuil.
KCC2: Canal potassium-chlore de type 2
NIRS : Near-infrared spectroscopy
NKCC1 : Canal sodium-potassium-chlore de type 1
NMDA : N-methyl-D-aspartate
nRT : noyau réticulaire du thalamus
PEV : potentiel évoqué visuel
PPSE : potentiel post-synaptique excitateur
PPSI : potentiel post-synaptique inhibiteur
POm : noyau postéromédial du thalamus
R_{in} : résistance membranaire d'entrée
sem : erreur standard de la moyenne
 τ : constante de temps
VL : noyau ventrolatéral du thalamus
VPM : noyau ventral postéromédial du thalamus
WAG/Rij: Wistar Albino Glaxo from Rijwijk

Chapitre 1-1 :

Introduction générale et présentation de la thèse

L'épilepsie est la maladie neurologique la plus fréquente après la migraine; elle touche presque 1% de la population générale, soit 500 à 600000 personnes en France. Cette maladie est plus fréquemment rencontrée chez l'enfant comparé aux autres tranches d'âges, avec deux particularités : l'importance des épilepsies idiopathiques, d'évolution spontanément favorable, et l'hétérogénéité des syndromes et des étiologies. Parmi la population infantile, on recense plus de 4000 nouveaux cas d'épilepsie chaque année en France (Hauser et al 1993; Roger 2005). Le contrôle de l'épilepsie pédiatrique par un traitement médicamenteux varie d'un syndrome épileptique à l'autre, avec des caractéristiques pharmacocinétiques et de tolérance différentes de l'adulte. Heureusement, le traitement contrôle souvent les crises d'épilepsie, mais environ 25% des enfants ne sont pas libres de crise et le traitement peut parfois induire une aggravation des crises épileptiques ou des fonctions cognitives (Gayatri & Livingston 2006). D'autre part, certains enfants vont garder des difficultés cognitives et/ou scolaires, même si le traitement contrôle leurs crises, sans qu'une explication physiopathologique précise puisse être donnée actuellement. Les épilepsies les plus fréquentes sont les épilepsies idiopathiques, liées à la maturation cérébrale, dont les deux chefs de file sont l'épilepsie-absence et l'épilepsie partielle rolandique (autrement appelée à « pointes centro-temporales »). Les syndromes épileptiques idiopathiques sont très nettement liés à l'âge ; ils débutent exclusivement dans l'enfance mais peuvent se prolonger à l'âge adulte.

Au sein des syndromes épileptiques survenant chez l'enfant, j'ai choisi d'orienter mes travaux de recherche vers l'épilepsie-absence, d'une part en raison de sa grande fréquence parmi les patients que je suis amenés à prendre en charge en tant que neuropédiatre, et d'autre part, en raison de

l'utilisation dans mon laboratoire d'accueil d'un modèle animal génétique possédant une grande homologie avec la pathologie humaine, le Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg (GAERS). En effet, dans ce modèle, 1/ les symptômes critiques sont très similaires à ceux présentés par les enfants: les crises ne sont pas convulsives et consistent simplement en un arrêt comportemental avec une atténuation des réponses à des modifications de l'environnement, 2/ les crises sont concomitantes de décharges de pointes-ondes (DPO) rythmiques dans l'électroencéphalogramme (EEG), 3/ la maladie débute avec un intervalle libre après la naissance et 4/, l'effet des molécules anticonvulsivantes est identique dans les deux espèces. L'existence de ce modèle animal permet d'utiliser des techniques invasives intracérébrales pour approcher le fonctionnement des neurones et des réseaux neuronaux cérébraux dans cette épilepsie. De telles techniques ne sont pas applicables à l'heure actuelle chez l'homme.

Je commencerai mon introduction en présentant en détail l'épilepsie-absence, puis je m'attarderai sur les modèles animaux génétiques, leur homologie avec la pathologie humaine et leurs intérêts pour la recherche. Enfin, je développerai les propriétés anatomo-fonctionnelles de la boucle thalamo-corticale, son rôle dans l'intégration des informations sensorielles et dans la physiopathologie des crises d'absence en m'appuyant sur les données humaines et animales. Je développerai en particulier les données actuelles permettant de localiser un foyer ictogénique responsable du déclenchement des DPO présentes lors des crises d'absence.

Après une présentation des objectifs spécifiques de mes recherches, je fournirai une description détaillée des méthodes expérimentales, essentiellement des approches électrophysiologiques multi-échelle *in vivo*, et analytiques utilisées. La section Résultats exposera les données obtenues au cours de ma thèse (publiées ou en cours de publication), soit exclusivement dans mon laboratoire, soit en collaboration avec quatre équipes cliniques de neuropédiatrie. J'exposerai 1/ les conséquences des DPO sur les fonctions physiologiques du cortex cérébral, 2/ le rôle des interneurones inhibiteurs corticaux dans le contrôle des décharges

épileptiques corticales. J'ai ajouté en annexe, par souci de cohérence avec mes travaux de recherche, l'article (en cours de publication) réalisé en collaboration avec l'équipe d'Antoine Depaulis qui décrit les conséquences d'une irradiation du foyer ictogénique sur l'expression et les propriétés électro-cliniques des crises.

Dans la discussion générale, je développerai notamment les possibles apports de mes résultats obtenus à partir du modèle animal dans la physiopathologie épileptique humaine, en particulier l'implication fonctionnelle d'un foyer ictogénique cortical et la compréhension des séquences physiopathologiques sous-tendant l'initiation, le maintien et la résolution des crises d'absence.

Chapitre 1-2 : Epilepsie-absence typique de l'enfant

1. Historique du syndrome d'épilepsie-absence

Les crises épileptiques de type absence sont reconnues depuis plusieurs siècles, la 1^{ère} description étant attribuée à Poupart en 1705 (Hirsch 2005). Le siècle suivant voit le début des classifications des épilepsies. Elles se répartissent alors en 3 groupes : petit mal, grand mal et vertige épileptique. L'épilepsie-absence, autrement appelée « petit mal », est déjà individualisée. En 1924, Adie découvre que l'hyperventilation est un excellent moyen de déclencher des absences et donne de la maladie, une définition quasi-complète : « une maladie avec un début explosif entre l'âge de 4 et de 14 ans, faite de crises épileptiques mineures, monotones, fréquentes, courtes, très légères, ayant une sévérité uniforme et se répétant pratiquement quotidiennement pendant des semaines, des mois ou des années, n'étant pas influencée par les médicaments antiépileptiques (de l'époque), n'altérant pas le développement mental et psychologique et disparaissant finalement spontanément sans rechute » (Adie 1924). En 1935, Gibbs, Lennox et Davis utilisent l'EEG tout juste découvert chez l'homme par H. Berger en 1929, pour montrer que les absences sont associées sur l'EEG à des DPO à 3 hertz (Hirsch 2005). En 1970, Gastaut divise l'épilepsie-absence en absences typiques, caractérisées par un trouble du contact isolé, et absences atypiques, au cours desquelles d'autres symptômes peuvent apparaître.

Les absences ont été officiellement reconnues comme un type de crise à part entière en 1981 (ILAE 1981). L'épilepsie absence typique de l'enfant a été ensuite individualisée en tant que syndrome épileptique en 1989, par la ligue internationale contre l'épilepsie (figure 1) (ILAE 1989). Ces crises sans convulsion motrice, on été appelées « petits accès » épileptiques ou « petit mal » par opposition aux « grandes » crises désignant les crises tonico-cloniques (Hirsch 2005). La dernière classification internationale de 2010 dénombre 3 types de crises d'absence, les absences typiques, les absences

atypiques et les absences avec symptômes associés : myoclonies des paupières et myoclonies plus diffuses.

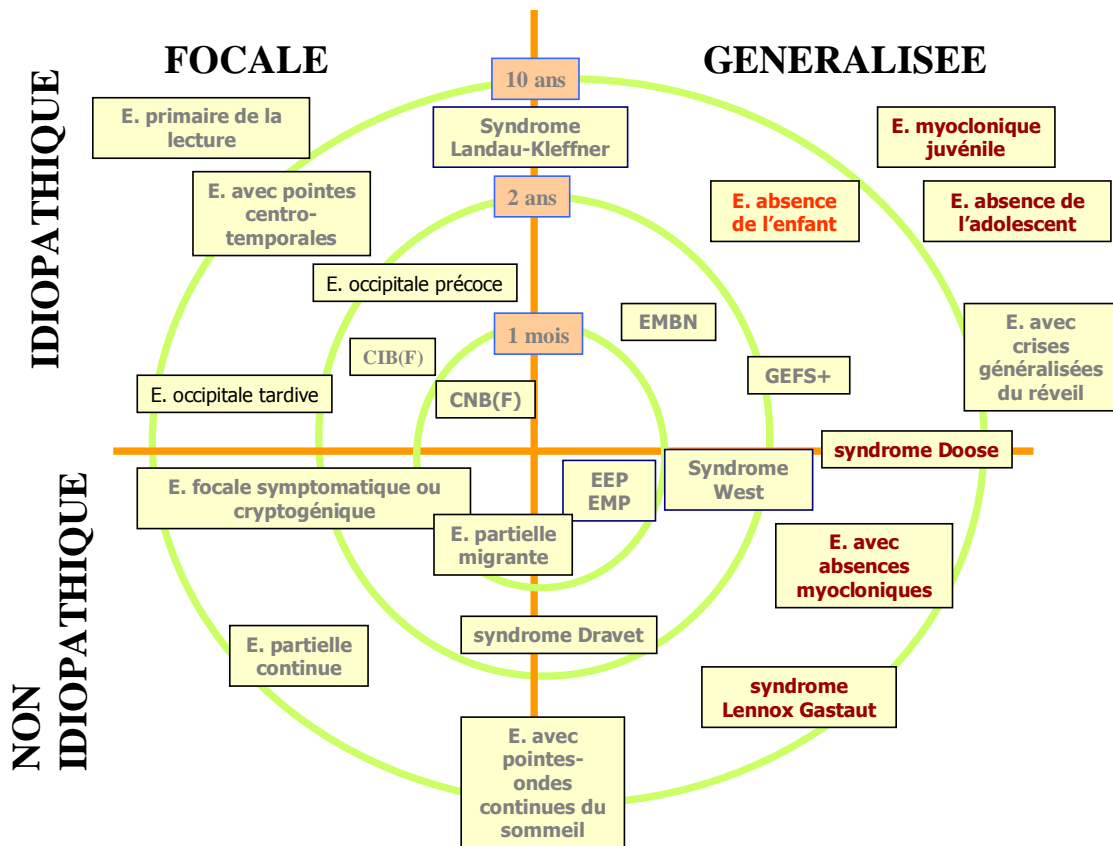


Figure 1 : Syndromes épileptiques, classés par âge, par origine idiopathique ou non, et par topographie focale ou généralisée. Les syndromes en rouge regroupent tous les syndromes comprenant des crises de type absences, typiques ou atypiques. D'après (Tich & Pereon 1999).

CNB(F) : convulsions néonatales bénignes (familiales), CIB(F) : convulsions infantiles bénignes (familiales), E : épilepsie, EEP : encéphalopathie épileptique précoce, EMBN : épilepsie myoclonique bénigne du nourrisson, EMP : épilepsie myoclonique précoce, GEFS+ : épilepsie généralisée avec crises fébriles associées à d'autres types de crises dans les antécédents familiaux.

2. Epidémiologie

L'incidence annuelle de l'épilepsie-absence, chez les enfants de moins de 15 ans a été évaluée entre 6.3/100.000 et 8/100.000 (Loiseau et al 1990; Olsson 1988). C'est le deuxième syndrome épileptique de l'enfant par ordre de fréquence, après l'épilepsie à pointes centro-temporale. La prévalence atteindrait 10 à 19% des épilepsies chez l'enfant de moins de 15 ans (Berg et al 2000; Callenbach et al 1998). L'épilepsie-absence de l'enfant est

légèrement plus fréquente chez les filles que chez les garçons avec 59 à 73% de filles (Dura Trave & Yoldi Petri 2006; Urena-Hornos et al 2004).

3. Clinique

L'âge de début est un des éléments du diagnostic. Il se situe généralement entre 4 et 10 ans (figure 1) (Panayiotopoulos 2005a). Un début avant l'âge de 3 ans est rare. Quand l'épilepsie-absence survient plus tardivement (après 8-10 ans), on parle d'épilepsie-absence de l'adolescent et le pronostic est alors moins bon. L'épilepsie-absence survient le plus souvent chez des enfants sans antécédent personnel, sans difficulté scolaire préalable. Par contre, il existe fréquemment des antécédents familiaux d'épilepsie idiopathique ou de crise fébrile.

Dès les premières secondes de la décharge, on observe un arrêt de l'activité en cours qui persiste pendant toute la durée des pointes-ondes. L'arrêt de l'activité s'associe à une rupture de contact isolée et parfois à des clonies des paupières relativement discrètes. La rupture du contact peut dans certains cas être partielle, ou une activité automatique motrice peut persister, sans signification diagnostique ou pronostique (Hirsch 2005). Des myoclonies palpébrales discrètes peuvent être observées (Panayiotopoulos 2005b). En revanche, la classification proposée en 2005 par Loiseau et Panayiotopoulos considère les myoclonies palpébrales systématiques soutenues et les absences déclenchées par des stimuli spécifiques, comme des critères d'exclusion d'une épilepsie-absence typique de l'enfant.

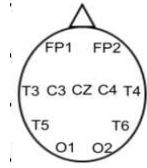
La durée des crises est courte, 4 à 20 secondes, mais elles peuvent se répéter 10 à 100 fois par jour. Leur grande fréquence pluriquotidienne est un argument en faveur du diagnostic d'épilepsie-absence typique de l'enfant.

Plusieurs facteurs favorisant les crises ont été décrits, au 1^{er} rang desquels, l'hyperpnée. L'hyperpnée déclenche très facilement des absences et doit être utilisée systématiquement lors de l'EEG au moment du diagnostic, pour enregistrer des crises et acquérir un diagnostic de certitude, puis pendant le suivi de l'enfant pour s'assurer de l'efficacité complète du traitement. Les crises surviennent également plus volontiers

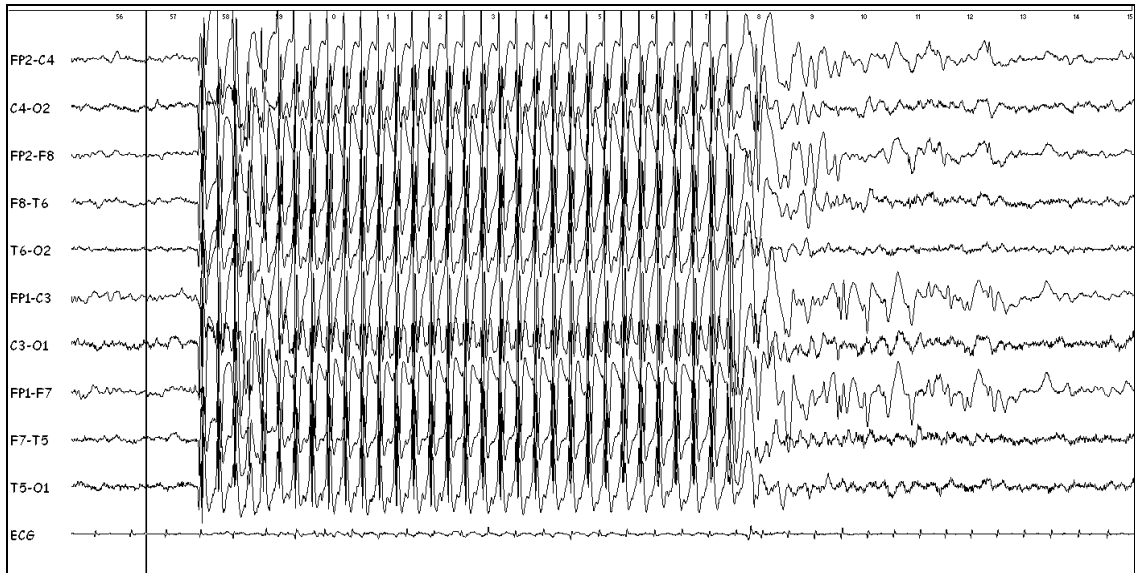
lorsque l'attention se relâche, typiquement en période de fatigue (fin de journée, réveil). D'autres facteurs moins systématiques sont rapportés comme les émotions négatives (chagrin, peur, colère), ou des facteurs métaboliques (hypoglycémie) (Suls et al 2009).

4. Electroencéphalogramme

La définition actuelle de l'épilepsie-absence inclut des données EEG, pour distinguer les absences typiques, concomitantes de DPO régulières à 3 Hz, se détachant d'une activité de fond normale (figure 2), et les absences atypiques, plus lentes à 2.5 Hz, irrégulières, parfois asymétriques, sur une activité de fond mal organisée. Dans l'épilepsie-absence typique de l'enfant, l'EEG intercritique est normal. Il peut cependant exister des bouffées de pointes-ondes généralisées, trop courtes pour être associées à des manifestations cliniques visibles. On peut retrouver également, des ondes lentes postérieures occipitales sans signification pathologique (Plouin 2006). Au début des crises, apparaissent brutalement des DPO bilatérales et symétriques, apparemment généralisées et synchrones, très amples, comportant 1 ou 2 pointes maximum par complexe de pointe-onde (figure 2) (*ILAE 1989*). Si le nombre de pointes par complexe est supérieur ou égal à 3, le pronostic sera plus réservé (Panayiotopoulos et al 1989). L'amplitude des pointes-ondes présente un gradient antéro-postérieur, plus amples sous les électrodes frontales (Bancaud et al 1965; Ferri et al 1995). On peut observer également un ralentissement de la fréquence des pointes-ondes en fin de décharge. Sadleir et ses collaborateurs ont analysé 339 crises d'absence et montré que dans 50% des cas, la décharge initiale consiste en une courte ($0,5 \pm 0,4$ sec) décharge focale souvent bilatérale et localisée dans les régions frontales, puis la généralisation est très rapide (Sadleir et al 2006). Cette observation reste en accord avec la définition d'une crise « généralisée » établie par la dernière classification internationale de 2010. En effet, une crise « généralisée » est maintenant considérée comme une crise engageant rapidement au moins une large partie des réseaux neuronaux bilatéraux (Berg et al 2010).



A. en 10 μ V/cm



B. en 20 μ V/cm

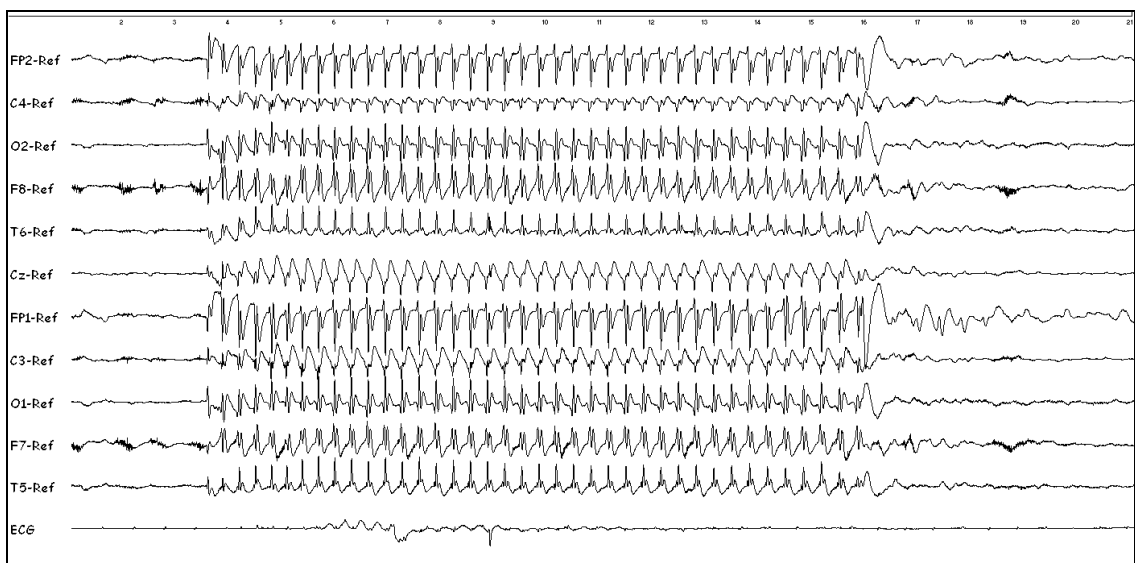


Figure 2 : Crise d'absence typique enregistrée en EEG de scalp chez un enfant de 7 ans. La décharge est présentée ici en amplitude 10 μ V/cm et en montage bipolaire, paramètres de lecture courante des tracés EEG (A), puis en amplitude réduite de moitié (20 μ V/cm) et en montage monopolaire, pour permettre une meilleure visualisation des pointes-ondes (B). Données personnelles.

5. Imageries standard et fonctionnelle

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) anatomique est considérée comme normale chez les patients porteurs d'épilepsie absence, même si des anomalies non spécifiques de localisations diverses peuvent être observées chez près d'un quart d'entre eux (Betting et al 2006a). Une seule étude met en évidence une augmentation de volume dans la partie antérieure du thalamus chez les patients souffrant de crises d'absence (Betting et al 2006b). Une autre étude montre des plages de diminution de la substance grise au sein du thalamus (Chan et al 2006).

En ce qui concerne d'éventuels changements fonctionnels en période intercritique, une étude rapporte un rapport N-Acétylaspartate sur créatine, marqueur de dysfonctionnement neuronal, effondré dans le thalamus des patients adultes porteurs d'épilepsie-absence, en comparaison de patients non épileptiques (Fojtikova et al 2006). La diminution du rapport N-Acétylaspartate sur créatine ne serait pas corrélée à la fréquence des crises ou à la durée d'évolution de l'épilepsie. Cette étude suggère donc que cette anomalie est bien liée au dysfonctionnement cérébral à l'origine de la maladie épileptique sous-jacente et non pas à la répétition des crises elles-mêmes (Fojtikova et al 2006).

Lors des DPO, des études en magnétoencéphalographie, en EEG à haute résolution, en Spectroscopie dans le proche InfraRouge (Near-infrared spectroscopy : NIRS) et en IRM fonctionnelle sont en faveur d'une activation conjointe du thalamus et du cortex antérieur. Il semble que l'activation débute par le cortex frontal, avant l'embrassement cortical diffus et thalamique retrouvé pendant le corps de la décharge. Les résultats de ces études seront exposés avec de plus amples détails dans la discussion générale consacrée à la physiopathologie des crises d'absence.

6. Etiologie

L'épilepsie-absence de l'enfant est considérée comme une épilepsie d'origine génétique dans la nouvelle classification des épilepsies proposée par la Ligue internationale contre l'épilepsie (Berg et al 2010). L'origine génétique est attestée par la grande fréquence de cas familiaux. Cependant, cohabitent au sein de ces familles plusieurs types de syndromes épileptiques, le plus souvent idiopathiques: convulsions fébriles, épilepsie avec crises généralisées, épilepsie myoclonique juvénile, épilepsie-absence de l'enfant ou de l'adolescent, et syndrome de Doose. La transmission héréditaire ne semble donc pas monogénique. Les épilepsies généralisées familiales sont associées à des anomalies génétiques variées. Dans l'épilepsie-absence, de nombreuses mutations génétiques ont été suspectées, touchant principalement les sous-unités du récepteur GABA (*GABRG2*, *GABRA1*, *GABRB3*, *GABRA5*) ou touchant les gènes codant pour les canaux calciques (*CACNA1A*, *CACNA1G*, *CACNA1I*, *CACNAB4*, *CACNAG2*, *CACNAG3*) (Yalcin 2012). Par exemple, une mutation dominante du gène codant pour la sous-unité γ du récepteur GABA-A (*GABRG2*) est identifiée dans une famille de crises fébriles où plusieurs individus présentent des absences (Marini et al 2003). Dans une autre famille, une mutation dominante de la sous-unité *GABRB3* est retrouvée (Tanaka et al 2008). Des variants alléliques du gène *CACNA 1H* sont considérés comme des facteurs de susceptibilité, pouvant favoriser les crises d'absence, sans en être directement responsables (Chen et al 2003). Il est également rapporté des absences dans des familles avec mutation des gènes codant pour les sous-unités du canal sodique voltage-dépendant (*SCN1A* ou *SCN1B*) (Audic-Gerard et al 2003; Lerche et al 2001)

7. Pronostic de l'épilepsie

A une époque où les traitements anti-absence n'existaient pas, il était déjà acquis que les absences finissaient par disparaître avec le temps. En effet, les absences disparaissent dans 90-94% des cas à l'adolescence (Dulac 2010; Loiseau et al 1995). Quand elles persistent à l'âge adulte, elles sont

alors souvent moins fréquentes (Currier et al 1963; Panayiotopoulos 2005b). La durée d'évolution de l'épilepsie-absence est en moyenne de 6,6 années avant de disparaître (Currier et al 1963). L'âge de guérison varie habituellement entre 10 et 14 ans. Un début avant 10 ans est de meilleur pronostic que les absences débutant chez l'adolescent (Loiseau et al 1995). De même, la pharmacosensibilité après une première monothérapie est considérée comme de bon pronostic (Currier et al 1963).

La disparition des absences n'est pas toujours synonyme de guérison, des crises généralisées tonico-cloniques peuvent survenir, ou l'épilepsie peut évoluer vers une épilepsie myoclonique juvénile (Delgado-Escueta et al 1999). Le risque de survenue de crises tonico-cloniques est évalué à 26% (Loiseau et al 1995). Elles surviennent la plupart du temps 5 à 10 ans après le début des absences (Loiseau et al 1983). Des facteurs de risque de survenue de crises tonico-cloniques ont été évoqués : l'âge de début des absences tardif, la survenue d'états de mal, le sexe masculin, la pharmacorésistance. En cas de retard de mise en route d'un traitement efficace ou de pharmacorésistance, 68 à 85% des patients présenteraient des crises tonico-cloniques (Guye et al 2001).

En conclusion, le taux de guérison, défini comme la disparition de tous les types de crises n'est pas connu. Selon les critères d'inclusion des études, il est estimé entre 33 et 78%. Avec un traitement adapté et précoce, 70% des patients seraient guéris, contre 18% des patients avec un traitement non optimal (Hirsch 2005).

8. Pronostic cognitif

Le pronostic cognitif de l'épilepsie-absence de l'enfant a longtemps été considéré comme excellent, d'autant plus que la maladie est souvent contrôlée par les anticonvulsivants et disparaît spontanément à l'adolescence. Pourtant, l'adaptation sociale reste médiocre pour 30% des patients, même lorsqu'ils sont en rémission (Loiseau et al 1983). Son caractère bénin est définitivement remis en cause dans les années 2000. Des difficultés d'attention sont retrouvées chez 61% des patients non traités, et chez 35% des enfants dont les crises sont contrôlées (Caplan et

al 2008; Glauser et al 2010; Siren et al 2007; Vega et al 2010). Les troubles du comportement ne sont pas rares, et apparaissent au cours de l'évolution de la maladie chez 30% des enfants traités pour épilepsie-absence. Vingt pour cent des patients sont en échec scolaire et 25% présentent de déficits cognitifs en mémoire visuelle et en mémoire non verbale (Caplan et al 2008; Echenne et al 2001; Pavone et al 2001; Siren et al 2007; Urena-Hornos et al 2004). Le suivi à l'âge adulte de ces patients met en évidence un niveau scolaire plus faible et des difficultés psychosociales et émotionnelles plus importantes que pour une population contrôlée, porteuse d'une maladie chronique rhumatologique (Wirrell et al 1997). L'épilepsie-absence est associée à un niveau élevé d'anxiété et de stress, (Caplan et al 2005; Caplan et al 2008). De plus, un début focal frontal des DPO sur l'EEG serait également un facteur de risque d'atteinte cognitive et comportementale et serait également associé à un risque accru de pharmacorésistance (Jocic-Jakubi et al 2009; Lagae et al 2001).

La physiopathologie de l'atteinte cognitive n'est pas encore élucidée. Elle semble liée à des dysfonctionnements intercritiques et critiques des réseaux neuronaux entre le thalamus, les structures corticales et sous-corticales (Henkin et al 2005). De plus, les circuits thalamo-corticaux sont impliqués à la fois dans l'épilepsie-absence et dans certains troubles psychiatriques dont la dépression, ce qui pourrait expliquer les comorbidités et leur retentissement cognitif et scolaire (Hughes & Crunelli 2005). Les études en imagerie montrent une activation du cortex frontal et pariétal en précritique et une activation du thalamus, du cortex moteur et somato-sensoriel pendant les crises. Cette activation inclut donc un réseau habituellement impliqué dans les mécanismes attentionnels et de traitement de l'information (Berman et al 2010; Bulteau 2011). Les DPO pourraient altérer les communications inter-hémisphériques, en particulier entre les lobes frontaux, qui possèdent des interconnexions nombreuses entre les deux hémisphères (Killory et al 2011). La persistance des atteintes neuropsychologiques en intercritique pourrait être liée à des anomalies développementales.

9. Hypothèse expliquant la rupture de contact

Les crises d'absence se manifestent par une rupture de contact isolée. La physiopathologie de cette rupture de contact demeure inconnue. On pourrait la rapprocher de certaines activités physiologiques, par exemple le sommeil lent, au cours desquelles les oscillations synchronisées au sein de la boucle thalamo-corticale interrompent la perception consciente de l'environnement en filtrant les informations extérieures et/ou en empêchant leur affectation à la zone corticale appropriée (Kostopoulos 2001; Llinas & Steriade 2006; Steriade 2000; Timofeev & Steriade 2004). Ce phénomène pourrait expliquer la rupture de contact ictale dans l'épilepsie-absence. Elle serait causée par l'interruption de l'intégration normale de l'information dans certaines régions spécifiques (Blumenfeld 2005; Blumenfeld et al 2009; Cavanna & Monaco 2009).

Il existe de nombreux arguments pour une implication focale ou multifocale et non généralisée du cortex pendant la rupture de contact critique. L'implication de l'ensemble du cortex n'est pas nécessaire pour générer une rupture du contact avec l'environnement, ainsi des crises avec rupture de contact isolée sont rapportées lors de décharges focales frontales ou temporales (Lux et al 2002). La rupture de contact pourrait refléter des déficits cognitifs spécifiques, prédominant dans le cortex frontal bilatéral. Pendant les crises, on peut observer des déficits cognitifs hétérogènes avec une prédominance de l'atteinte verbale sur l'atteinte motrice, quand les tâches demandées restent simples (Gastaut et al 1954). Le premier niveau d'intégration corticale de l'information extérieure semble préservé pendant les crises épileptiques, ce qui a été démontré dans l'épilepsie focale occipitale. En effet, les potentiels évoqués persistent lors des crises et attestent la possibilité d'un accès à l'information sensorielle (Hughes et al 1985; Tsai et al 2010; Wang et al 2005a). Dans certains cas, l'amplitude des potentiels évoqués sensoriels peut même être augmentée (Hughes et al 1985). De plus, la prise de décision fondée sur des afférences sensorielles semble particulièrement affectée par la survenue de DPO dans l'épilepsie-absence (Mirsky & Vanburen 1965). Jung a montré dès 1939 que des stimulations externes avaient la capacité de raccourcir ou d'interrompre les crises, en particulier des stimuli auditifs puissants et des stimuli douloureux

(Jung 1939). Des investigations en imagerie cérébrale chez des patients présentant des DPO généralisées, ont montré une activation thalamique bilatérale associée à une activation ou à une dé-activation corticale relativement focale, en frontal latéral et en pariétal (Blumenfeld et al 2009; Hamandi et al 2006).

Ces données, combinées aux données obtenues chez l'animal (Blumenfeld 2005; Blumenfeld et al 2003; Cavanna & Monaco 2009) mènent à l'hypothèse qu'une atteinte fonctionnelle transitoire focale probablement dans les aires associatives corticales pourrait être responsable de la rupture de conscience et de l'incapacité à générer une sensation consciente et une réponse sensorimotrice pendant les crises d'absence.

Enfin, le timing de survenue de la rupture de contact par rapport au début de la décharge électrique peut être variable. L'absence de réponse aux ordres simples peut débuter plusieurs secondes avant la survenue de la décharge, ou plusieurs secondes après le début (Mirsky & Vanburen 1965). Ces différences de timing pourraient refléter l'atteinte hétérogène de tâches cognitives spécifiques.

En résumé, l'ensemble de ces observations suggère que les crises d'absence pourraient affecter de façon spécifique certaines fonctions cognitives jouant un rôle crucial dans la rupture de contact, et épargnant d'autres fonctions. La distribution spatiale des changements cérébraux sous-jacents, ainsi que leurs mécanismes neuronaux restent inconnus (Blumenfeld 2005). Cependant, la forte connectivité entre les deux régions frontales, accélérant la généralisation des DPO aux deux hémisphères, pourrait expliquer la perte de contact ictale, rapide et totale (Heo et al 2006), comme dans l'épilepsie temporale, où la perte de contact ictale est due à une synchronisation excessive entre le thalamus et les aires corticales associatives (Arthuis et al 2009). Un mécanisme similaire pourrait intervenir dans l'épilepsie-absence, en raison de l'implication précoce de la boucle thalamo-corticale.

10. Traitements

La mise en route d'un traitement dans l'épilepsie-absence a pour but de contrôler les crises, invalidantes par leur grande fréquence, et pouvant

compromettre la scolarité de l'enfant, jusqu'à ce que l'épilepsie soit guérie spontanément par la maturation cérébrale. Historiquement, l'éthosuximide apparaît en 1951 puis vient le valproate de sodium. Actuellement, les drogues de choix sont la lamotrigine, l'éthosuximide et le valproate de sodium (Beydoun & D'Souza 2012; Glauser et al 2010; Hwang et al 2012). La phénytoïne et le phénobarbital sont contre-indiqués en raison de leur inefficacité (Panayiotopoulos 2001; 2005b). Le traitement permet de faire disparaître les crises d'absence chez 50-75% des patients (Coppola et al 2004; Glauser et al 2010; Hwang et al 2012). En cas de pharmacorésistance, d'autres molécules peuvent être essayées, comme le levetiracétam ou les benzodiazépines. Le traitement pourra être progressivement arrêté après 1 à 2 ans sans crise, et d'autant plus facilement que l'âge de l'enfant s'approche de l'adolescence.

11. Autres syndromes épileptiques avec crises d'absence

Je me limiterai dans ce chapitre, aux épilepsies avec crises d'absence au sens électro-clinique du terme, c'est-à-dire associant une rupture de contact isolée à une DPO diffuses sur l'EEG. D'autres épilepsies peuvent comporter des crises avec rupture de contact, en particulier les crises focales temporales ou frontales. Ces ruptures de contact ne sont pas des absences au sens où l'EEG montre une décharge focale et non des DPO diffuses à 3 Hz.

- L'épilepsie-absence juvénile de l'adolescent

Dans ce syndrome, les absences débutent plus tardivement, après l'âge de 8 ans, avec un pic de fréquence à 10-12 ans, sans prépondérance de sexe. Ce syndrome représente environ 11% des épilepsies avec crises d'absence (Wolf 2005). Les crises sont moins fréquentes, que dans l'épilepsie-absence de l'enfant, souvent non quotidiennes. La persistance des absences à l'âge adulte est plus fréquente (30 à 50 %), ainsi que la survenue de crises tonico-cloniques généralisées (Dulac 2010).

Sur l'EEG, l'activité de fond est habituellement normale. Les crises sont caractérisées par des DPO diffuses et symétriques prédominant sur les

régions frontales, de fréquence 3-4 Hz. L'onde lente peut être précédée par 2-3 pointes. Les décharges peuvent être plus longues (16.3 +/- 7.1 sec) que dans l'épilepsie-absence typique (12.4 +/- 2.1 sec) (Hirsch 2005). Les décharges peuvent parfois être fragmentées.

- L'épilepsie myoclonique juvénile

Elle représente une forme très commune d'épilepsie idiopathique, elle représente 5 à 10% des épilepsies (Thomas 2005). Elle débute autour de la puberté, par des secousses myocloniques non rythmiques, prédominant aux membres supérieurs, classiquement matinales, sans altération de la conscience. A ces myoclonies, s'ajoutent parfois des crises généralisées tonico-cloniques. Des absences sont rapportées dans 10 à 33% des cas, mais elles sont rarement au premier plan (Panayiotopoulos 1999). Quand elles existent, elles sont peu fréquentes et brèves, et peuvent donc facilement passer inaperçues.

Sur le tracé EEG, l'activité de fond est normale, mais peut comporter des complexes de pointes-ondes intercritiques diffus ou en regard des régions antérieures. L'EEG critique montre des DPO souvent plus irrégulières que lors de crises d'absence typiques de l'enfant. Les patients sont pharmacosensibles, mais également pharmacodépendants, les antiépileptiques doivent donc être poursuivis à long terme.

- Les absences myocloniques

Ce syndrome est beaucoup plus rare que les absences typiques et constitue 0.5 à 1% des épilepsies de l'enfant. L'âge de début est globalement celui de l'épilepsie absence de l'enfant, mais les absences sont associées à des secousses myocloniques des membres supérieurs et de la face nombreuses, synchrones des pointes-ondes observées sur le tracé électroencéphalographique (Bureau 2005). La fréquence des crises et leur durée sont identiques à l'épilepsie-absence typique. Un retard mental est présent dans 45 % des cas. Ce syndrome sort donc du groupe des épilepsies idiopathiques, et se rapproche d'un trouble du développement neurologique plus global (Dulac 2010).

Sur le tracé EEG, l'activité de fond peut être anormale. L'EEG critique est représenté par des DPO à 3 Hz bilatérales. Ces DPO ne peuvent être

différenciées de celles de l'épilepsie-absence typique de l'enfant, que si des électrodes de myogramme enregistrent les myoclonies concomitantes. Les DPO peuvent laisser apparaître un début et/ou une fin plus progressives que dans l'épilepsie-absence typique.

- Le syndrome de Doose ou épilepsie myoclonico-astatique

L'épilepsie myoclonico-astatique débute entre 2 et 5 ans chez un enfant sans antécédent, en dehors d'éventuelles crises fébriles simples. Le sexe ratio est en faveur du sexe masculin. Ce syndrome épileptique est caractérisé par la présence de myoclonies massives entraînant des chutes, de crises tonico-cloniques, et d'absences. Les absences sont présentes dans 62 à 89% des cas (Doose 1992; Kaminska et al 1999). L'évolution est souvent favorable en quelques années avec un traitement approprié (Dulac 2010).

Sur le tracé EEG, l'activité de fond est le plus souvent ralentie dans les fréquences θ (4 à 7 Hz), monomorphe et peut comporter des anomalies intercritiques à type de bouffées de poly-pointes ou de pointes-ondes diffuses à 2-3 Hz. Quand les crises d'absence existent, elles ne peuvent pas être différenciées sur l'EEG de l'épilepsie-absence typique de l'enfant (Kelley 2010).

- Le syndrome de Lennox-Gastaut

Le syndrome de Lennox-Gastaut appartient aux encéphalopathies épileptiques, il est responsable d'une régression cognitive associée à une épilepsie active souvent pharmacorésistante. L'âge de début se situe entre 3 et 10 ans, en général avant 8 ans, avec une discrète prédominance masculine. Ce syndrome est caractérisé par une triade symptomatique : crises toniques (à prédominance nocturne), atoniques (souvent responsable de chutes traumatiques) et absences, associées à des pointes-ondes lentes sur l'EEG (Beaumanoir 2005). Les absences sont décrites comme atypiques : on retrouve, plus fréquemment que dans l'épilepsie-absence, une rupture du contact qui n'est que partielle, et la possibilité d'une poursuite de l'activité automatique. Elles sont également fréquemment associées à une diminution du tonus, responsable d'un affaissement progressif du corps pendant la crise. La survenue d'états de mal d'absence est fréquente. Le syndrome de Lennox-Gastaut apparaît souvent chez des

enfants préalablement épileptiques, il vient alors compliquer l'évolution de leur syndrome épileptique initial. Les étiologies sont multiples, et la réalisation d'une IRM cérébrale est indispensable (Dulac 2010).

Sur le tracé EEG, l'activité de fond est anormale dans plus de 50% des cas, elle est alors plus lente et mal structurée et peut comporter des bouffées de pointes-ondes asymptomatiques à prédominance bifrontale. En sommeil, on retrouve typiquement une accentuation des anomalies intercritiques, associées à des rythmes rapides diffus avec ou sans traduction clinique. Les crises d'absence atypiques sont caractérisées par des DPO diffuses bilatérales mais plus lentes que dans l'épilepsie-absence typique, autour de 2 à 2,5 Hz, plus irrégulières en fréquence et en amplitude, plus amples sur les régions antérieures, et dont le début et la fin sont beaucoup moins brusques que dans l'épilepsie-absence de l'enfant.

- Le syndrome de De Vivo

Le syndrome du déficit en transporteur de glucose de type 1 est une encéphalopathie épileptique avec microcéphalie, retard du développement psychomoteur, spasticité, ataxie, dysarthrie. Les symptômes sont majorés en période préprandiale. Ce syndrome épileptique peut à la fois être considéré comme une étiologie d'épilepsie-absence, mais aussi comme un diagnostic différentiel, avec la survenue de pointes-ondes irrégulières en bouffées, sans manifestation clinique (Milh 2011). Douze pour cent des patients ayant débuté des absences avant l'âge de 4 ans auraient un syndrome de De Vivo (Suls et al 2009). Des chutes de tête et des myoclonies s'associent aux absences précoces. L'aggravation des symptômes par le jeûne doit faire évoquer le diagnostic. La recherche d'un déficit en transporteur du glucose par mutation génétique du gène GLUT1 est donc fortement recommandée si les absences débutent avant l'âge de 4 ans. Le diagnostic est fait par l'étude du ratio glycorachie/glycémie qui est abaissé. La reconnaissance de cette pathologie à une incidence sur la prise en charge, un régime cétogène excluant les sucres rapides de l'alimentation étant le seul traitement efficace (Wang et al 2005b).

Les anomalies EEG de ce syndrome nouvellement décrit semblent hétérogènes. L'activité de fond peut être normale dans un tiers des cas, ou ralentie dans un autre tiers ou enfin, peut comporter des bouffées de

pointes-ondes intercritiques (Leary 2003). Les décharges critiques sont le plus souvent identiques aux crises de l'épilepsie-absence typique, mais peuvent parfois être moins rapides ou moins régulières (Leary 2003).

- La maladie de Lafora

Cette maladie génétique à transmission autosomique récessive appartient aux épilepsies myocloniques progressives. Elle débute entre 6 et 19 ans par des crises généralisées tonico-cloniques, des crises partielles visuelles impliquant souvent des hallucinations, ou par des absences isolées. Des myoclonies erratiques s'installent ensuite et progressent rapidement, ainsi que la détérioration cognitive. La détérioration mentale devient évidente après quelques années puis évolue rapidement vers une démence. Le décès survient après 2 à 10 ans d'évolution. Deux gènes expliquent la majorité des cas de maladie de Lafora : EPM2A (6q23-25) et EPM2B (6p22), mais un troisième locus est probablement impliqué (Minassian et al 1998).

L'EEG retrouve initialement des anomalies généralisées en bouffées, impossible à discriminer des épilepsies idiopathiques généralisées, puis l'activité de fond se ralentit et les anomalies prédominent dans les régions postérieures. Une photosensibilité est fréquente.

Chapitre 1-3 :

Présentation de la boucle thalamo-corticale

Les données humaines et animales mettent en avant l'implication de la boucle thalamo-corticale dans les crises d'absence. Je vais maintenant décrire l'anatomie et les propriétés de réseau de cette boucle en détaillant l'organisation du thalamus, du cortex, puis leurs interconnectivités.

1. Thalamus

- Généralités

Principal constituant du diencephale, le thalamus est un important centre relais sensoriel. Les 2 thalamus sont situés de part et d'autre du 3^{ème} ventricule et se rejoignent à travers la fine fente du 3^{ème} ventricule par la commissure grise. Le thalamus comprend de nombreux noyaux étroitement interconnectés avec le cortex. Toutes les voies sensorielles font relais dans le thalamus avant de se projeter sur le cortex, en dehors des voies olfactives. Le thalamus véhicule également d'autres modalités vers le cortex: fonctions motrices, limbiques et vigilance.

- Rôles

Les rôles principaux du thalamus sont de participer 1/ au relais de l'information sensorielle périphérique vers les cortex somatosensoriel et moteur (en particulier les noyaux postérieurs), 2/ aux processus attentionnels, y compris la régulation de la vigilance et du sommeil (en particulier les noyaux médians et réticulé) (Buchel et al 1998), 3/ aux activités cognitives, comme la mémoire ou le langage (en particulier les noyaux médian et antérieur) (Johnson & Ojemann 2000). Les lésions thalamiques en particulier si elles sont bilatérales, entraînent des troubles de la vigilance pouvant aller jusqu'au coma, une atteinte mnésique antéro et rétrograde, des troubles psychiatriques (confusion, troubles du

comportement et de l'humeur) et un déficit oculomoteur (paralysie de la verticalité, trouble de convergence, diplopie). Les troubles du comportement et de l'humeur sont liés à l'interruption de la boucle thalamo-fronto- limbique.

- Les noyaux thalamiques

Anatomiquement, le thalamus est divisé en trois groupes nucléaires antérieur, médian et latéral (figure 3), auxquels s'ajoute le noyau thalamique réticulaire, qui forme une fine lame entourant la partie latéro-dorsale du thalamus (Steriade 1990).

Le **groupe nucléaire antérieur** comprend : un noyau principal, le noyau antéro-ventral, et deux noyaux accessoires, les noyaux antéro-dorsal et antéro-médian. Ce groupe appartient au circuit mamillo-hippocampo-thalamo-cortical décrit par Papez. Ses connexions corticales s'établissent avec des structures appartenant au système limbique (gyrus cingulaire, aire rétrospléniale, cortex entorhinal et subiculum), et dans une moindre mesure avec le cortex préfrontal (Goldman-Rakic 1985; Preuss & PS. 1987).

Le **groupe nucléaire médian**, constitué d'un noyau unique : le noyau dorso-médian. Il est affilié au système limbique par ses afférences amygdaliennes et ses connexions réciproques avec le cortex olfactif. Il entretient des relations privilégiées avec le cortex préfrontal, mais se connecte également avec le gyrus cingulaire antérieur, l'aire motrice supplémentaire, et envoie quelques fibres en direction du gyrus temporal supérieur, de l'insula et du lobule pariétal inférieur (Giguere & PS. 1988; Steriade et al 1997).

Le **groupe nucléaire latéral**, regroupant en fait une multitude de noyaux, que l'on divise schématiquement en :

- Noyaux ventraux : le ventral antérieur, le ventral latéral, le ventral médian et le ventral postérieur. Le noyau ventral postérieur est lui-même subdivisé en 3 parties : ventral postérieur latéral, médian (VPM) et inférieur. Ce groupe nucléaire représente l'essentiel des noyaux de relais spécifiques dédiés au système moteur et sensitif. Schématiquement, le noyau ventral antérieur reçoit des afférences principalement pallidales, et projettent sur le cortex préfrontal et prémoteur. Le noyau ventral latéral reçoit des afférences pallidales et cérébelleuses et se connecte avec l'aire

motrice supplémentaire, l'aire 4, le cortex prémoteur. Enfin, le noyau ventral postérieur reçoit les afférences lemniscales, spino-thalamiques et trigéminales, ainsi que quelques afférences vestibulaires. Ses connexions corticales intéressent principalement le cortex somesthésique primaire et dans une moindre mesure le cortex somesthésique secondaire.

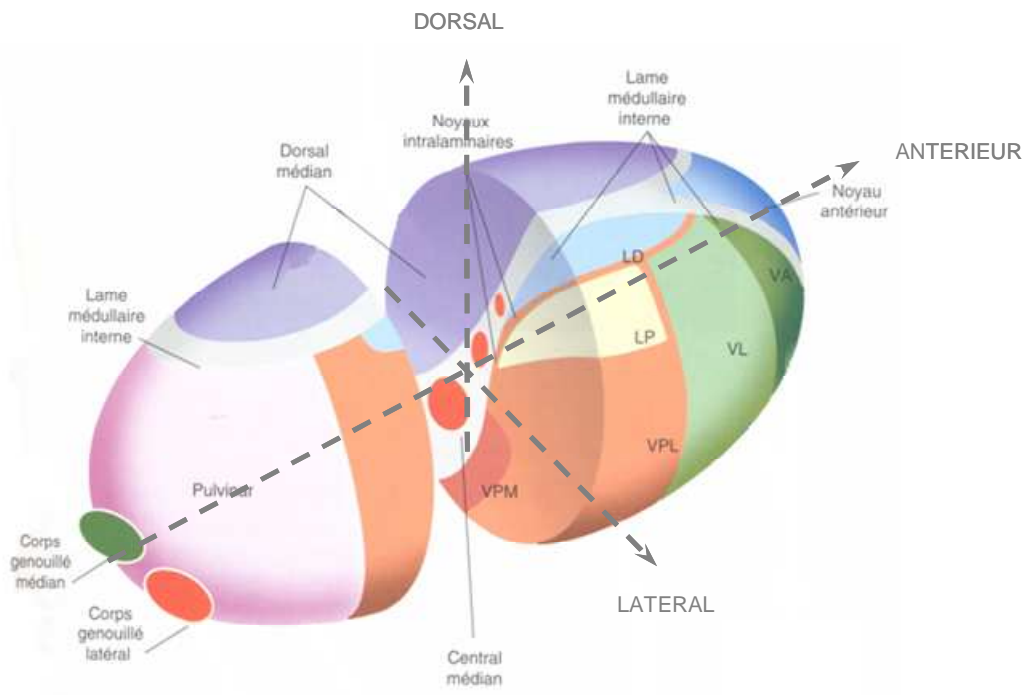


Figure 3 : Vue générale du thalamus droit et de ses différents noyaux, D'après (Nadeau et al 2006)

- Noyaux dorsaux : les noyaux latéro-dorsal et latéro-postérieur. Le noyau latéro-dorsal est en fait souvent apparié aux noyaux antérieurs, avec qui il partage de nombreuses similarités, notamment en termes de connexions. Le noyau latéro-postérieur est connecté principalement avec les aires pariétales associatives (Steriade et al 1997).

- Pulvinar : Ce volumineux complexe nucléaire forme à lui seul le pôle postérieur du thalamus sur lequel sont apposés les autres noyaux thalamiques, plus particulièrement les noyaux thalamiques médians (noyaux centro-médian et centro-latéral principalement) puis les noyaux ventropostérolatéral et latéro-postérieur depuis son bord médial jusqu'à sa partie plus latérale (figure 3). Latéralement, il est bordé par la lame médullaire externe et le noyau réticulaire thalamique.

Chez le rat et la souris, le noyau postéromédial du thalamus (POm) est le principal noyau postérieur (Fox 2008).

Au sein de la lame médullaire interne se trouve une multitude de petits noyaux, plus ou moins bien individualisés, regroupés sous le nom de **noyaux intralaminaires**. Le plus volumineux et le mieux défini d'entre eux est le noyau centro-médian. Citons également le noyau parafasciculaire, le central latéral et le central médian. A la partie la plus médiane du thalamus, enfoui dans le plancher du 3^{ème} ventricule se trouve un autre groupe de noyaux de petites tailles, assez mal individualisés, et dénommés **noyaux de la ligne médiane**. Ces deux groupes cellulaires constituent le « système thalamique diffus », par opposition aux « noyaux de relais spécifiques » dont les projections corticales ciblent une région délimitée du cortex, en général dédiée à un système anatomo-fonctionnel donné. En réalité, les projections corticales de ces groupes nucléaires sont beaucoup mieux organisées et beaucoup moins diffuses. Elles intéressent principalement le système moteur pour les noyaux intralaminaires, et le système limbique pour la ligne médiane. Les connexions sous-corticales avec le striatum et le tronc cérébral sont également très développées (Cesaro et al 1999).

Sur la face la plus latérale de la masse thalamique, séparée de cette dernière par la lame médullaire externe, le **noyau réticulaire** (nRT) constitue macroscopiquement un feuillet enveloppant la face externe du thalamus. Il est le seul noyau thalamique qui n'est composé que de neurones inhibiteurs GABAergiques. Il reçoit des afférences du cortex, des noyaux thalamiques, des neurones corticothalamiques, des neurones thalamo-corticaux, et du tronc cérébral et envoie des fibres GABAergiques inhibitrices vers l'ensemble des noyaux thalamiques de relais. Il possède donc un rôle majeur dans le contrôle de la boucle cortico-thalamo-corticale et joue un rôle dans l'ensemble des fonctions du thalamus (Guillery et al 1998).

Enfin, extériorisées de la masse thalamique proprement dite mais appendues à cette dernière au niveau de la face inférieure du pulvinar, on retrouve les **corps genouillés interne et externe**, également appelés médian et latéral, et qui sont les relais spécifiques des voies auditives et visuelles.

- Projections

Projections afférentes

Les neurones thalamiques reçoivent des afférences nombreuses : 1/ issues des régions corticales vers lesquelles les neurones thalamo-corticaux se projettent, 2/ internes au thalamus, 3/ issues des ganglions de la base, de la moelle épinière et du tronc cérébral (Percheron et al 1996). On peut distinguer deux types de noyaux thalamiques : 1/ ceux qui reçoivent des connexions issues des fibres ascendantes du tronc cérébral et de la moelle épinière et issues des neurones pyramidaux de la couche VI du cortex, 2/ ceux qui reçoivent des afférences des neurones corticaux de la couche V.

On différencie deux types de neurones cortico-thalamiques, lesquels obéissent également à des règles anatomiques précises :

- La majorité des cellules cortico-thalamiques se situent dans la couche VI, et projette de manière réciproque sur le noyau thalamique ayant émis des fibres thalamo-corticales en direction de la même aire corticale. Ce sont des cellules de petite taille, dont les arbres dendritiques s'élèvent jusqu'aux couches III-IV où ils reçoivent les afférences thalamiques. Leurs axones donnent naissance à quelques collatérales récurrentes intracorticales destinées aux couches III-IV, avant de projeter sur le thalamus, où ils vont donner une fibre afférente pour le noyau réticulaire, et une autre pour le thalamus dorsal. Ces cellules respecteraient donc presque fidèlement le principe de réciprocité, se projetant massivement sur les cellules thalamo-corticales codant pour la même zone sensorielle. Certaines connexions, moins denses, pourraient cependant s'établir avec les zones immédiatement adjacentes (pour revue, Steriade et al 1997).

- Une autre population de fibres cortico-thalamiques émerge de la couche V, et se distingue par un corps cellulaire plus large, un arbre dendritique ascendant jusqu'à la couche I, un axone plus épais qui envoie plusieurs collatérales au sein des couches III et surtout V, où ils s'étendent horizontalement sur une assez longue distance. Contrairement aux cellules de la couche VI, cet axone n'envoie aucune collatérale au noyau réticulaire, et ses projections thalamiques peuvent s'étendre à d'autres noyaux que ceux qui envoient les fibres thalamo-corticales réciproques. Il n'obéit donc pas strictement au principe de réciprocité. Après avoir donné des collatérales thalamiques, l'axone « cortico-thalamique » poursuit son

chemin jusqu'à sa destination finale au sein du tronc cérébral ou de la moelle épinière (Guillery & SM. 2002).

Projections efférentes

Les fibres thalamo-corticales font synapses au niveau de différentes couches corticales. Historiquement, cette distinction constituait la base d'une séparation des noyaux thalamiques en deux systèmes anatomo-fonctionnels différents : le système thalamique diffus d'une part et les noyaux thalamiques de relais d'autre part. Ainsi, le système thalamique diffus, et plus particulièrement les noyaux intralaminaires, représentaient un système dont les projections larges, atteignant les couches superficielles du cortex cérébral, étaient à l'origine de la réponse recrutante corticale observée après stimulation à basse fréquence de ces noyaux (Dempsey & RS. 1942). Les noyaux de relais projetaient quand à eux exclusivement sur les couches III et IV.

En fait, il semble que les deux types de projection soient intriqués, en proportion plus ou moins élevée suivant le noyau considéré, et ils correspondent à deux types cellulaires différents :

- Les cellules dont le soma est marqué par la parvalbumine sont majoritairement représentées dans les noyaux de relais dit spécifiques, et projettent sur la couche IV et la partie profonde de la couche III de certaines aires corticales, de manière spécifique et topographiquement organisée (Jones 1998).
- Les cellules marqués par la Calbindine ont une expression plus ubiquitaire au sein du thalamus dorsal (Jones 1998). Leurs projections corticales tendent à être plus diffuse sur la surface corticale, et se font sur les couches superficielles (couche I et II ± partie superficielle de la couche III). Les afférences périphériques de ces cellules sont également moins spécifiques (Jones 2002).

Le noyau réticulaire (nRT) se projette vers les autres noyaux du thalamus et ne possède aucune connexion réciproque avec le cortex (Percheron et al 1996).

Les efférences du thalamus sont glutamatergiques et majoritairement ipsilatérales, excepté le noyau réticulaire qui émet des projections

GABAergiques vers le thalamus ipsi- et controlatéral (Pare & Steriade 1993).

- Propriétés électrophysiologiques des neurones thalamiques

Les neurones des **noyaux de relais** du thalamus possèdent deux modes de fonctionnement, déterminés selon l'état de vigilance du sujet et le potentiel de membrane du neurone : décharges toniques soutenues ou décharges en bursts (ou bouffées) (figure 4).

Les décharges toniques sont caractérisées par une décharge régulière et soutenue de potentiels d'action. Elles surviennent lorsque le potentiel de membrane est au-dessus de -60 mV. Il est généralement admis que ce mode de décharge est le seul capable de relayer des informations sensorielles vers le cortex cérébral au cours de l'éveil (Steriade 2000).

Les décharges en bursts sont des bouffées de potentiels d'action séparées par des temps sans décharge (figure 4). Elles surviennent lorsque le potentiel de membrane est au-dessous de -65mV et mettent alors en jeu une conductance calcique à bas-seuil (I_T , déinactivée par l'hyperpolarisation puis activée par la repolarisation) et le courant cationique non-spécifique I_h , activé par l'hyperpolarisation et entraînant une dépolarisation lente de la cellule, activant secondairement I_T (figure 4). Elles sont mises en jeu lors du sommeil lent et sont responsables des fuseaux de sommeil (ou « spindles ») lors du sommeil de stade 2 (Steriade 2000). Le noyau réticulaire assure l'inhibition locale grâce à des projections réciproques intrathalamiques.

Les neurones du **nRT** émettent des décharges rythmiques de bouffées de potentiels d'action. Ces bouffées sont secondaires à la mise en jeu des conductances intrinsèques dont le courant I_T . Les bouffées d'activité du nRT génèrent des potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSI) dans les neurones thalamo-corticaux. L'excitation des neurones thalamo-corticaux est donc médiée par l'inhibition, et entraîne une activité oscillatoire des neurones du nRT. L'activité rythmique dans les neurones corticaux, générée par l'excitation d'origine thalamique, favorise aussi l'activité oscillatoire dans l'ensemble de la boucle thalamo-corticale (Steriade et al 1993).

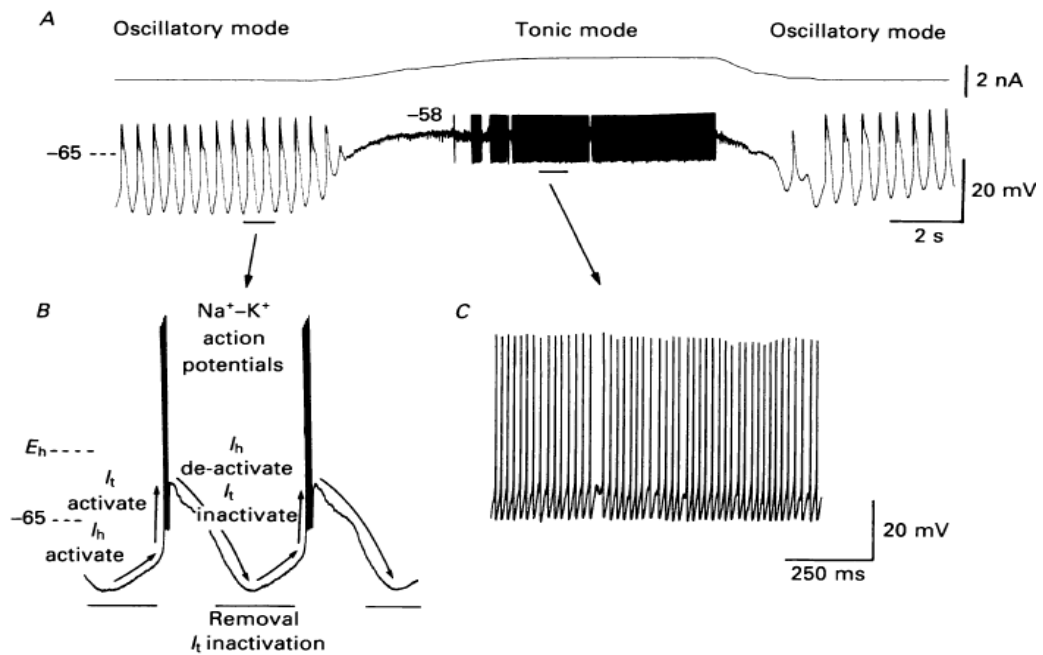


Figure 4 : Deux modes de décharges des neurones thalamiques des noyaux relais.

- A. Passage d'un mode de décharge oscillatoire rythmique à 2 Hz vers un mode tonique, puis retour à un mode oscillatoire. La première transition se fait par dépolarisation de la cellule à -58 mV en injectant un courant continu.
- B. Activité oscillatoire et les courants ioniques impliqués. L'activation du courant calcique à bas seuil I_T dépolarise la membrane jusqu'au seuil permettant un burst de potentiels d'action dépendant des ions Na^+ et K^+ . la dépolarisation déactive le courant I_h . La repolarisation de la membrane déinactive à son tour I_T et active I_h , qui va dépolariser la membrane et entraîner un processus oscillatoire régénératif.
- C. Agrandissement de l'activité en mode tonique.

2. Cortex

- Anatomie

Le néocortex est la partie la plus superficielle du cerveau des mammifères. Il est divisé en territoires fonctionnels appelés aires corticales, délimitées en fonction de caractères histologiques et fonctionnels. Ainsi on distingue en particulier les aires visuelles occipitales, somatosensorielles centrales, motrices précentrales. Le cortex est composé de neurones organisés en six couches cellulaires, notées de I (la plus superficielle) à VI (la plus profonde). L'épaisseur des couches corticales varie en fonction de l'aire corticale; la couche IV en particulier est absente dans le cortex moteur.

Le tissu néocortical est organisé en colonnes fonctionnelles (Hubel & Wiesel 1962; Mountcastle 1957). Ces auteurs ont montré que les neurones localisés

dans les différentes couches d'une colonne corticale sensorielle, orientée perpendiculairement à la surface cérébrale, répondent de manière similaire pour un stimulus ayant une modalité sensorielle donnée. Ce même type de spécificité a été retrouvé par la suite pour le système des vibrisses des rongeurs (Bruno & Sakmann 2006; Wilent & Contreras 2004). L'anatomie spécifique du cortex somato-sensoriel sera décrite au sein du chapitre suivant, consacré au rôle de la boucle thalamo-corticale dans l'intégration de l'information sensorielle chez les rongeurs.

- Morphologie cellulaire

Soixante-dix à 90 % des neurones corticaux sont glutamatergiques et excitateurs. Ils se divisent en deux catégories : 1/ des **neurones pyramidaux** (figure 5A), présents dans toutes les couches corticales exceptée la couche 1 et prédominant dans les couches II/III et V/VI, et 2/ des **neurones épineux étoilés** non pyramidaux (figure 5B) des couches I, II et IV, dont les axones courts projettent à l'intérieur de la colonne ou sur les colonnes voisines (Markram et al 2004; Meyer et al 2010).

Les 15 à 30% restant sont des interneurones GABAergiques généralement inhibiteurs. Les plus fréquents sont les **cellules en panier** ou « basket cells » (figure 5B), retrouvés dans les couches corticales III, IV et V, qui représente 50% des interneurones inhibiteurs et projettent sur les dendrites des neurones pyramidaux et des interneurones voisins. Les **cellules en chandelier** sont situées dans les couches II-VI et projettent sur les axones voisins (figure 5B), les **cellules de Martinotti**, dans les couches II et VI et projettent dans la couche I. Les **cellules bipolaires** s'étendent verticalement jusqu'aux couches I et VI, elles peuvent être excitatrices par l'intermédiaire du VIP ou inhibitrices par l'intermédiaire du GABA. Les **cellules en doubles bouquets** atteignent toutes les couches corticales depuis les couches II et V où elles se trouvent (Markram et al 2004). Leur organisation est restreinte, exclusivement régionale et elles ont un rôle de régulation locale. Enfin, les cellules de type **neuroglial** ont été moins étudiées, elles comportent de nombreuses dendrites fines sur l'ensemble du pourtour cellulaire.

La connectivité au sein du réseau neuronal dépend 1/ de la morphologie des neurones (étendue de l'arbre dendritique, des projections axonales, et des

connections synaptiques), 2/ de leur rôle excitateur ou inhibiteur, 3/ de l'efficacité des connections synaptiques (Lubke & Feldmeyer 2007).

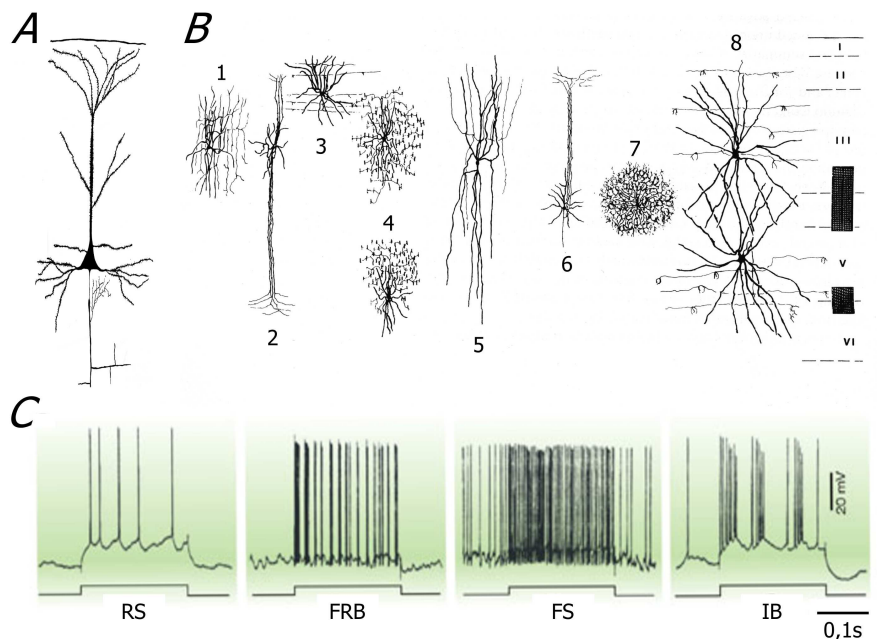


Figure 5 : Principaux types de neurones pyramidaux et non pyramidaux des aires corticales motrice et sensorielle. (A) neurone pyramidal. (B) neurones non pyramidaux. 1: neurone en arcade ; 2: neurone en double bouquet ; 3: neurone en petit panier ; 4: neurone en chandelier ; 5: neurone "à peptide" ; 6: neurone étoilé non pyramidal de la couche IV (excitateur) ; 7: cellule de type neuroglial ; 8: neurone en grand panier. Les rectangles noirs (à droite) indiquent la localisation des terminaisons thalamo-corticales afférentes spécifiques D'après (Jones 1975). (C) Enregistrement intracellulaire dans le cortex moteur chez le chat. Réponse de neurones de type RS, FRB, FS et IB à un même échelon de courant dépolarisant (0,8nA, 200ms) au cours de l'éveil tranquille. D'après (Steriade 2004)

- Propriétés électrophysiologiques des neurones corticaux

Les neurones peuvent être classés selon leurs propriétés de décharge. On en reconnaît 4 classes: Regular Spiking (« décharge régulière », Intrinsic bursting (« bouffées intrinsèques »), Fast Spiking (« décharge rapide », Fast-rhythmic-bursting (« bouffées rythmiques rapides ») (figure 6) (Contreras 2004; Steriade 2004). Nous utiliserons par commodité la terminologie anglaise.

Les neurones de type **Regular Spiking (RS)** présentent un mode de décharge de potentiels d'action tonique, de fréquence régulière et relativement constante. Cette fréquence peut se réduire au cours de la décharge (phénomène d'adaptation) (Contreras 2004). Les neurones RS sont tous des neurones pyramidaux.

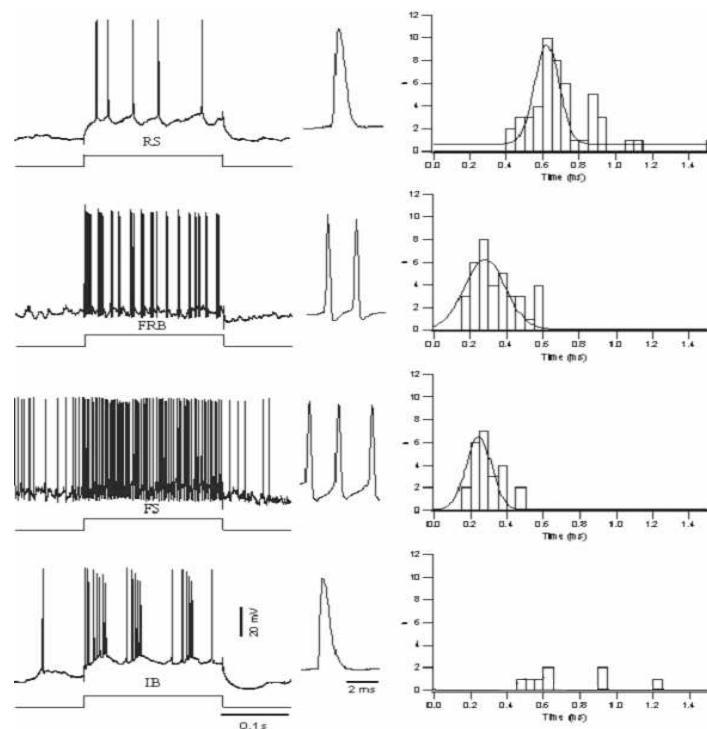


Figure 6: Identification des différentes classes de neurones corticaux selon leurs propriétés électrophysiologiques.

La colonne de gauche montre les réponses des neurones de la couche V, de type regular-spiking (RS), fast-rhythmic-bursting (FRB), fast-spiking (FS) et intrinsically bursting (IB), à des pulses de courant dépolarisant (+0.8nA, 0.2 s). Les potentiels d'action amplifiés sont représentés sur la droite. Les neurones FRB et FS présentent des potentiels plus brefs. La colonne de droite illustre la largeur de ces potentiels d'action mesurée à mi-hauteur (n=117 neurones). D'après (Steriade 2001).

Les cellules pyramidales peuvent également appartenir à la catégorie **Intrinsic bursting (IB)** (figure 6) qui décharge en bouffées de 3 à 5 potentiels d'action à haute fréquence, environ 200 Hz, superposés à une dépolarisation sous-liminaire de grande amplitude. L'amplitude des potentiels d'action décroît au cours de la bouffée, en raison de l'inactivation des canaux sodiques voltage-dépendants à inactivation rapide. Le burst de potentiels d'action est interrompu par l'hyperpolarisation transitoire générée par l'entrée de calcium provoquant l'ouverture des canaux potassiques, entraînant une sortie de potassium de la cellule et une repolarisation membranaire.

Les neurones **Fast-rhythmic-bursting (FRB)** génèrent des bouffées de potentiels d'action à très haute fréquence (300 à 600 Hz) en clusters se répétant avec une fréquence de 30-50 Hz. Ce sont des neurones pyramidaux ou des interneurons en panier (Steriade 2004).

Enfin, les interneurones inhibiteurs composent la classe des neurones de type **Fast Spiking (FS)** (Steriade 2004). La durée de leur potentiel d'action est très courte (500 μ secondes) et peuvent survenir à haute fréquence (jusqu'à 800 Hz) sans adaptation, ni atténuation, avec le temps.

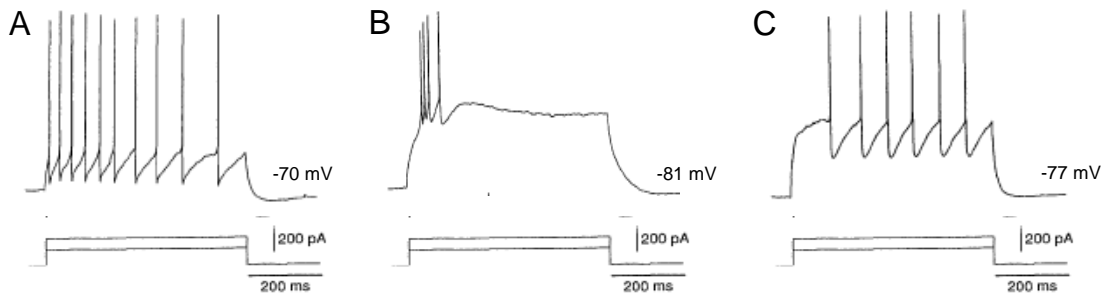


Figure 7: Caractéristiques électrophysiologiques de trois classes d'interneurones corticaux selon leurs propriétés de décharge. Leur identification est établie sur des réponses induites par des échelons de courant dépolarisant (+200 pA, 0.2 s). A : neurone de type Regular Spiking Non-Pyramidal (RSNP), dont le mode de décharge est régulier, B : neurone de type Low-threshold-spiking (LTS), qui déchargent sur le mode burst après une hyperpolarisation préalable, C : neurone de type Late-Spiking (LS) dont la décharge est retardée par rapport à la dépolérisation. D'après (Kawaguchi 1995)

D'autres types de décharge sont caractéristiques des interneurones inhibiteurs (Markram et al 2004). Les neurones de type **Low-threshold-spiking (LTS)** (figure 7), essentiellement situés dans la couche V, déchargent sur le mode burst après une hyperpolarisation préalable. Ce sont le plus souvent des cellules de Martinotti ou des cellules en double-bouquet.

Les neurones de type **Regular Spiking Non-Pyramidal (RSNP)** (figure 7), dont le mode de décharge ressemble aux neurones de type RS, sont situés dans les couches II/III. Ils correspondent aux cellules de Martinotti, aux cellules en panier et aux cellules bipolaires. Enfin, les cellules de type **Late-Spiking (LS)** (figure 7) dont la décharge est retardée lors d'une dépolérisation induite par l'injection d'un courant intracellulaire, sont également situées dans les couches corticales II/III et V, et correspondent aux cellules de type neuroglial.

Les interneurones de type **Irregular-spiking (IS)** déchargent un burst de potentiels d'action initial, suivi de potentiels d'action irréguliers. Ce sont des neurones bipolaires des couches II/III et V.

3. Organisation du système thalamo-cortical

- La connectivité thalamo-corticale

Les propriétés de la connectivité thalamo-corticale dépendent de la modalité fonctionnelle étudiée. Le système le plus étudié d'un point de vue anatomo-fonctionnel est le système somatosensoriel. Etant donné que j'ai spécifiquement étudié chez le GAERS le système des vibrisses, je détaillerai dans le chapitre suivant l'organisation anatomo-fonctionnelle du système thalamo-cortical associé à cette modalité sensorielle, cruciale chez le rongeur.

- La connectivité corticocorticale

Au sein du cortex, les connexions sont multiples entre les colonnes. Elles permettent l'intégration de plusieurs informations sensorielles et l'élaboration d'une représentation interne issue de différentes modalités sensorielles ou assemblant les diverses caractéristiques du stimulus (Schubert et al 2007). L'information sensorielle en provenance du noyau ventral postéromédial du thalamus (VPM) arrive par la couche IV, et va être relayée au sein des autres couches de la même colonne, créant une **connectivité verticale** (Lubke & Feldmeyer 2007). Les entrées thalamiques issues du noyau postéromédial du thalamus (POm) sont intégrées au niveau de la couche V puis dispatchées vers les couches II et III (Bureau et al 2006). La couche V est la seule à recevoir des afférences issues de toute la colonne corticale.

La **connectivité horizontale** assure quant à elle l'interconnexion entre colonnes. Elle est rendue possible grâce aux axones des neurones de la couche IV qui se propagent latéralement vers les colonnes adjacentes (Staiger et al 2004). Les connexions horizontales ont pour effet d'amplifier l'information reçue (Feldmeyer et al 2002).

Les **efférences** corticales sont issues des neurones pyramidaux des couches III, V et VI et principalement de la couche V (Fox 2008). Elles peuvent atteindre d'autres structures corticales ou les structures sous-corticales. Les projections sur les structures sous-corticales assurent un feed-back de l'information. Je détaillerai dans le chapitre suivant

l'organisation des efférences corticales associées à la modalité sensorielle issue du système des vibrisses.

- La connectivité corticothalamique

Vers les noyaux de relais

Les projections cortico-thalamiques sont environ dix fois plus nombreuses que les projections thalamo-corticales (Liu et al 1995). Leurs terminaisons représenteraient environ 80 % des connections sur les neurones thalamiques de relais (Van Horn et al 2000). Les neurones cortico-thalamiques sont généralement issus des couches V et VI du cortex et envoient également des ramifications vers les interneurons GABAergiques corticaux (Veinante et al 2000; Wright et al 2000; Zarrinpar & Callaway 2006).

Vers le nRT

Les connections cortico-thalamiques sur le nRT sont issues de fibres collatérales des axones corticothalamiques issus de la couche VI du cortex (Liu & Jones 1999). Les terminaisons d'origine corticale représentent 70% des synapses du nRT.

- La connectivité réticulo-thalamique

Les fibres efférentes du nRT projettent exclusivement dans le thalamus, vers les noyaux thalamiques ipsilatéraux. Il existe cependant des projections des neurones du nRT vers le thalamus dorsal controlatéral, inhibant les noyaux antérieurs, intralaminaires et le noyau ventromédial.

Chapitre 1-4 :

Organisation anatomo-fonctionnelle du système des vibrisses

Dans ce chapitre, je développerai le système d'intégration de l'information sensorielle issue des vibrisses. Ce système est au centre des résultats du premier article présenté dans la partie résultats.

Le système des vibrisses est particulièrement étudié chez les rongeurs, puisqu'il correspond au mode de contact avec l'environnement prédominant chez ces espèces. L'analyse de l'environnement par l'animal se fait par l'intermédiaire de contacts multiples des vibrisses sur les objets explorés et le niveau de performance dépend du nombre de vibrisses utilisées (Celikel & Sakmann 2007; Sachdev et al 2001). L'information sensorielle issue des vibrisses chemine via le tronc cérébral et les noyaux thalamiques jusqu'au cortex somatosensoriel, dont la majeure partie est occupée par le cortex en tonneaux (figure 8) (Meyer et al 2010). L'information est propagée avec une augmentation progressive du nombre de neurones de la périphérie au cortex. L'organisation des afférences montre une somatotopie précise qui se maintient de la périphérie au cortex : à chaque vibrisse correspond une unité dans le noyau trigéminal, une seule unité dans le thalamus et un tonneau dans la couche IV du cortex correspondant (figure 8). Lorsqu'un stimulus est intégré par ce système sensoriel, les cartes de représentation fonctionnelle s'activent. Elles sont composées d'assemblées neuronales, qui codent chacune pour différentes caractéristiques du stimulus.

1. Ganglion trigéminal

Les fibres afférentes innervant les vibrisses encodent l'ensemble des paramètres de la déflexion : amplitude, angle, vitesse, durée. Chaque fibre répond à une unique vibrisse. Les neurones du ganglion trigéminal peuvent répondre à des déflexions très faibles, de l'ordre de 5 à 10 μm . Il existe 1/ des neurones répondant rapidement et avec une durée de réponse courte,

qui codent pour la localisation de l'objet, et 2/ des neurones à adaptation lente qui représentent 60-75% des neurones, qui assurent la détection de la forme et texture de l'objet (Shoykhet et al 2000).

2. Tronc cérébral

Le tronc cérébral reçoit des fibres afférentes respectant la somatotopie précise des vibrisses. Par homologie avec le terme « barrel » utilisé pour nommer les unités fonctionnelles du cortex, le mot barreloïde désigne les unités fonctionnelles au sein du noyau VPM du thalamus, et le terme barrelette désigne les unités fonctionnelles du noyau trigéminal dans le tronc cérébral. Ainsi, l'information issue d'une vibrisse est transmise dans une barrelette trigéminal puis au sein d'un barreloïde thalamique et enfin, jusqu'à un barrel cortical (figure 8).

Les neurones trigéminaux peuvent regrouper une ou plusieurs vibrisses (Minnery & Simons 2003). Il existe là encore 2 types de neurones, 1/ les neurones à réponse phasique (70%), possédant une somatotopie d'une seule vibrisse et projetant dans le VPM, et 2/ les neurones à réponse tonique (20%), multi-vibrissaux (jusqu'à 16 vibrisses) et projetant dans le POm (Veinante & Deschenes 1999).

3. Thalamus

Les noyaux trigéminaux se projettent sur le thalamus contolatéral dans les noyaux VPM et POm (Fox 2008). Chaque vibrisse est représentée par 20 neurones thalamiques environ, formant une unité architectonique appelée « barreloïde » (figure 6). Chaque barreloïde répond à l'inflexion 1/ d'une vibrisse principale, avec une latence courte (4-7 ms), et 2/ de vibrisses adjacentes, avec une latence plus longue (> 8ms) (Fox 2008). La somatotopie est moins précise dans le POm, où les afférences sont multivibrissales (7-8 vibrisses) sans qu'une des vibrisses ait une importance prépondérante (Chiaia et al 1991).

A.

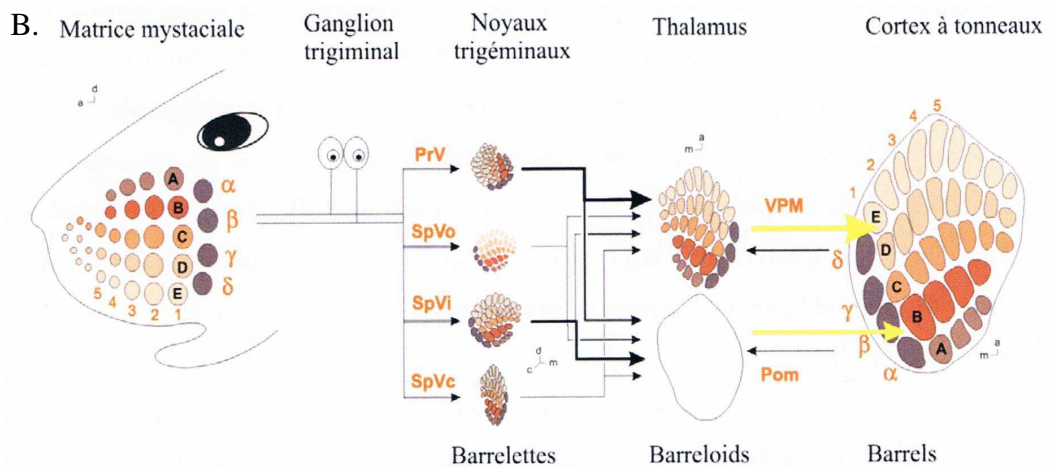
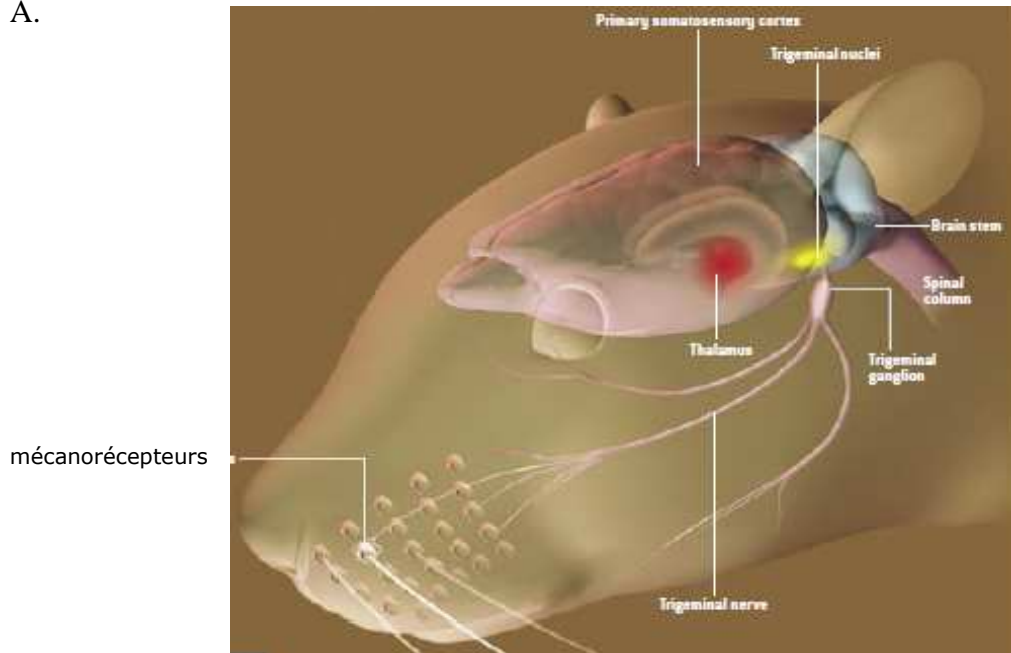


Figure 8 : Schéma de la somatotopie de l'intégration de l'information sensorielle, des vibrisses au cortex à tonneaux.

A. Schéma intégré des différents relais de l'information sensorielle issue des vibrisses. D'après Nicoletis et Ribeiro, 2006.

B. Cheminement de l'information sensorielle issue des vibrisses à travers le ganglion trigéminal, les noyaux trigéminaux du tronc cérébral, le thalamus puis le cortex somatosensoriel primaire. Chaque vibrisse est associée à une barrelette du tronc cérébral, à un barreloïde du thalamus, et à un tonneau cortical. PrV, noyau trigéminal principal ; SpVo, noyau spinal oralis ; SpVi, noyau spinal interpolaris ; SpVc, noyau spinal caudalis ; VPM, noyau ventral postéro-médial ; P Om, partie médiane du noyau postérieur. Schéma de Woolsey, reproduit dans (Yuste & Simons 1997).

L'information sensorielle est relayée par le tronc cérébral en deux voies distinctes, lemniscale et paralemniscale (figure 8). Il existe également une troisième voie appelée extralemniscale, décrite plus récemment, qui semble secondaire.

1/ la voie **lemniscale** emprunte le noyau thalamique VPM (Alloway 2008). Les neurones thalamo-corticaux du VPM émettent leurs axones vers les couches corticales III à VI de la colonne corticale correspondante, et principalement la couche IV (Chmielowska et al 1989). Il existe dans cette voie, une ségrégation précise de l'information sensitive, avec une somatotopie respectée à chaque relais. La voie lemniscale relaie une information monovibrissale. Elle est plutôt impliquée dans la propagation des informations de sensibilité proprioceptive, tactile et vibratoire.

2/ la voie **paralemniscale**, atteint le noyau POm (Diamond et al 2008). Les neurones de projection du POm dirigent leurs axones préférentiellement vers les couches I, IV et V de la colonne correspondante, au niveau des septa séparant les tonneaux (Bureau et al 2006; Chmielowska et al 1989; Koralek et al 1988). La somatotopie est moins précise dans cette voie et aucune carte anatomique précise n'a pu être mise en évidence dans le POm (figure 8) (Veinante & Deschenes 1999). Cette voie est importante pour les informations concernant la sensibilité tactile, thermique et douloureuse.

4. Cortex

Les territoires corticaux sensoriels sont organisés en unités fonctionnelles colonnaires. Dans le cortex somatosensoriel, les unités fonctionnelles sont appelées « tonneaux » ou « barrel » (figure 9). Ces unités en colonnes sont perpendiculaires à la surface cérébrale (figure 9) (Bruno & Sakmann 2006; Lubke & Feldmeyer 2007; Wilent & Contreras 2004). Les tonneaux sont organisés en 5 rangées dans chaque hémisphère et une colonne contient environ 20 000 neurones distribués dans les six couches corticales (Keller & Carlson 1999). Les tonneaux sont séparés par des zones plus pauvres en neurones, les septa, où transitent les dendrites des neurones de la couche 5 et les axones des neurones des couches supérieures. Le cortex en tonneaux occupe 13% de la surface corticale chez la souris, et 69% du cortex

somato-sensoriel (Fox 2008). Les neurones d'une même colonne corticale répondent à un stimulus donné, défini par des caractéristiques (orientation, localisation, durée) précises.

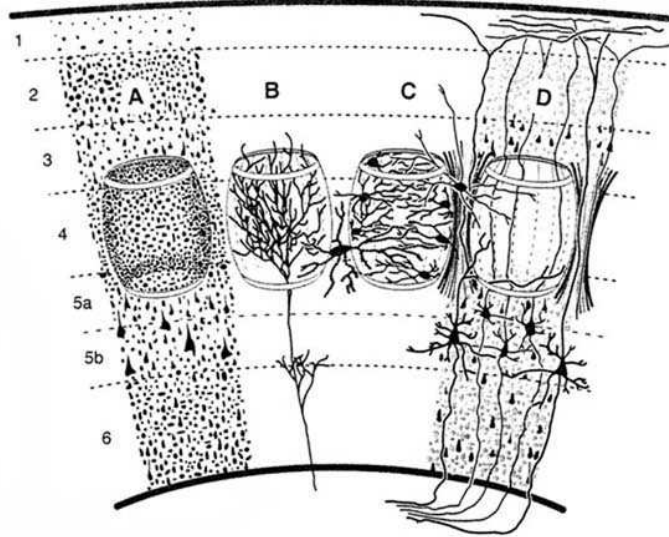


Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation du cortex somato-sensoriel primaire en « tonneaux »

- A. Distribution des corps cellulaires après coloration de Nissl, plus denses dans la couche IV.
- B. Distribution des afférences thalamo-corticales en provenance du VPM. A noter, la présence de collatérales vers les couches 3, 5 et 6.
- C. Corps cellulaires tendant leurs dendrites vers les tonneaux voisins.
- D. Organisation des septa : les dendrites apicales des neurones de la couche 5 et les axones des neurones des couches supérieures traversent préférentiellement les septa. D'après Waite et Tracey, 1995.

L'importance de la représentation corticale des différentes parties du corps varie beaucoup d'une espèce à l'autre. Chez les rongeurs, les vibrisses occupent une place beaucoup plus grande que les pattes dans le cortex somatosensoriel primaire. Une vibrisse unique va activer les neurones localisés au sein d'un seul tonneau, formant une somatotopie précise entre la position des vibrisses et la position du tonneau cortical correspondant (figure 9). Les projections thalamiques arrivent principalement dans la couche IV d'une colonne. La couche IV reçoit des projections de 43% des neurones thalamiques codant pour le déplacement d'une vibrisse (Bruno & Sakmann 2006). Puis l'information efférente quitte le cortex par les neurones de la couche V qui projettent à leur tour vers le thalamus, permettant ainsi un rétrocontrôle de l'information.

Les neurones pyramidaux sont les seuls à projeter vers d'autres structures, et il s'agit majoritairement de neurones de la couche V (Wise & EG 1977). Les projections vers des structures sous-corticales (thalamus, striatum, moelle épinière, pont et mésencéphale) proviennent des couches V/VI. Ces projections vers les structures sous-corticales assurent un feed-back de l'information. Les projections vers d'autres zones corticales (cortex somatosensoriel secondaire, cortex moteur, autre hémisphère) ont pour origine, outre des cellules de la couche V, des cellules des couches II/III (Fox 2008; Keller 1995).

Chapitre 1-5 : Modèles animaux génétiques

1. Intérêt des modèles animaux

L'identification des mécanismes cellulaires qui sous-tendent le déclenchement et la propagation des crises épileptiques restent un des grands enjeux de la recherche en épileptologie. Comprendre ces mécanismes passe par la caractérisation en temps réel, des activités électrophysiologiques au sein des circuits neuronaux présentant les décharges épileptiques (Charpier 2006).

Les techniques d'exploration de l'épilepsie chez l'homme se sont développées depuis les années trente, d'abord par l'EEG classique avec électrodes posées sur le crâne, puis par l'accès aux signaux intracrâniens grâce à la stéréoEEG avec électrodes intracorticales profondes. Dans l'épilepsie-absence, de telles explorations ne peuvent plus être proposées en raison de leur caractère non éthique. En effet, l'épilepsie-absence est souvent contrôlée par les médicaments antiépileptiques, et elle guérit le plus souvent spontanément à l'adolescence. Des enregistrements profonds avaient pourtant été réalisés dans les années 1950 mais ne pourraient plus être justifiés à notre époque. D'autres types d'approches par des enregistrements électrophysiologiques *in vitro* peuvent être proposés dans les épilepsies focales, après exérèse chirurgicale du foyer épileptique. Même si une chirurgie était envisageable, ce qui n'est pas le cas, une telle approche n'est pas applicable aux crises d'absence qui mettent en jeu de larges territoires cortico-thalamiques interconnectés accessibles uniquement quand les réseaux sont analysés dans leur globalité.

Enfin, les nouvelles techniques d'imagerie fonctionnelle permettent d'obtenir certaines données sur la connectivité de ces réseaux neuronaux, se heurtant à une résolution spatiale et temporelle limitée. L'utilisation de modèles animaux reste donc nécessaire pour compléter l'étude des mécanismes physiopathologiques des crises d'absence (Charpier 2006). Les modèles animaux permettent en particulier d'étudier les mécanismes

physiopathologiques cellulaires, et permettent de tester l'efficacité des molécules antiépileptiques.

La validation d'un modèle animal nécessite la vérification de trois critères : 1/ l'isomorphisme des symptômes entre le modèle et la pathologie humaine correspondante, 2/ l'homologie des mécanismes physiopathologiques et 3/ la similitude des profils pharmacologiques. Un grand nombre de modèles animaux ont été utilisés pour étudier les épilepsies absences. Les modèles présentant la plus forte homologie avec la pathologie humaine sont les modèles d'origine génétique, des modèles murins dont les animaux présentent spontanément des crises d'absence. Ils sont plus proches de la pathologie humaine que les modèles pharmacologiques, où les crises ne sont pas spontanées, mais secondaires à l'utilisation de substances pharmacologiques. Parmi les modèles génétiques, j'ai choisi pour mes recherches, d'utiliser les GAERS, dont les caractéristiques sont décrites ci-dessous.

2. Le rat WAG/Rij

- Propriétés cliniques des rats WAG/Rij

Les caractéristiques électrocliniques des rats WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo from Rijswijk) sont très proches de celles des GAERS. Tous les rats WAG/Rij adultes présentent des crises épileptiques associant un arrêt comportemental de l'animal, des clonies des vibrisses, hypotonie de la nuque responsable d'une chute lente de la tête et une tachypnée (Coenen & Van Luijtelaar 2003). Les crises épileptiques apparaissent à 2-3 mois de vie, plus tardivement que chez les GAERS (Depaulis 2006). A l'âge adulte, la récurrence des crises est de 15-20 par heure, d'une durée moyenne de 5 secondes. Comme dans la pathologie humaine, la fréquence des crises est augmentée pendant les états de veille calme et de sommeil lent léger (Depaulis 2006). Elles sont très rarement observées au cours du sommeil paradoxal. L'incidence des DPO chez les rats WAG/Rij est aussi fonction du rythme circadien. La fréquence des crises est maximale entre la quatrième et la cinquième heure de la période d'obscurité, et minimale au début de la période d'éclairement (van Luijtelaar et al 2002).

- Développement cognitif

Le développement et le comportement des rats WAG/Rij ont longtemps été considérés comme similaires à ceux de la souche non-épileptique Wistar dont ils sont issus (Coenen & Van Luijtelaar 2003). Cependant, des études récentes mettent en évidence la possibilité de troubles du comportement, notamment une anhédonie attestée par une activité exploratoire de moins bonne qualité, des périodes d'immobilité plus longues et une consommation de sucrose diminuée (Depaulis 2006; Sarkisova & van Luijtelaar 2011).

- Propriétés électriques des réseaux neuronaux lors des crises d'absence

Les crises d'absence sont concomitantes dans l'EEG, de DPO de fréquence 7 à 10 Hz, bilatérales, symétriques (Meeren et al 2002). Elles apparaissent vers l'âge de 2 – 3 mois (Depaulis 2006). Toutes les électrodes sont impliquées dans les crises, avec une prédominance dans les régions frontales.

- Pharmacologie des crises d'absence

Médicaments anticonvulsivants

La pharmacosensibilité de ce modèle génétique est superposable à la pharmacosensibilité des crises chez l'homme et dans l'autre modèle animal génétique (le GAERS) que je décrirai dans le paragraphe ci-dessous. L'éthosuximide et le valproate de sodium diminuent la fréquence des crises, la diphenylhydantoïne et la carbamazépine les augmentent (Coenen & Van Luijtelaar 2003).

Système GABAergique

Les décharges des rats WAG/Rij sont associées à une hyperactivité GABAergique. Les agonistes des récepteurs GABA_A (muscimol) et les inhibiteurs de la recapture du GABA (Tiagabine) augmentent l'incidence des crises. Les antagonistes des récepteurs GABA_A (bicuculline) et GABA_B (CGP35348 et CGP 36742) diminuent leur incidence (Coenen & Van Luijtelaar 2003). Le GABA a donc un effet aggravant sur les crises d'absence, comme chez les GAERS. Cependant, les benzodiazépines, agonistes allostériques des récepteurs GABA_A, diminuent la fréquence des

crises (Coenen & Van Luijtelaar 2003). Leur mécanisme d'action n'est pas élucidé à ce jour.

Système glutamatergique

Comme le GABA, le glutamate favoriserait également la survenue de crises. Les antagonistes glutamatergiques diminuent la fréquence des décharges tandis que leurs agonistes augmentent la survenue des crises (Coenen & Van Luijtelaar 2003).

3. Les modèles murins

Un certain nombre de souris mutantes (*Tottering*, *Lethargic*, *Stargazer*, *Mocha2j*, *Slow-Wave-epilepsy*) présentent dès les premières semaines de vie des décharges corticales ressemblant à celles décrites chez les GAERS et les rats WAG/Rij. Leur fréquence est comprise entre 5 et 7 Hz et elles sont associées à un arrêt comportemental (Crunelli & Leresche 2002). Cependant, ces modèles murins ont une moindre homologie avec la pathologie humaine, puisqu'elles n'expriment pas uniquement des absences, mais également d'autres types de crises, et des troubles neurologiques variés : ataxies, déficits locomoteurs ou pathologies cérébelleuses (Crunelli & Leresche 2002).

Les souris *tottering*, *lethargic* et *stargazer* présentent des mutations pour des canaux calciques voltage-dépendants (Crunelli & Leresche 2002). Ce type de mutation n'a pas été confirmé chez les patients porteurs d'épilepsie-absence, en dehors de quelques familles avec mutations du gène *CACNA1A*. De plus, des mutations de ce même gène ont également été retrouvées également dans d'autres pathologies neurologiques non épileptiques ou dans d'autres types d'épilepsie (Jouvenceau et al 2001) .

Les souris *Mocha2j* présentent une mutation du gène *Nhe 1* codant pour un échangeur Na^+/H^+ (Cox et al 1997). Un changement du pH cérébral, pourrait modifier la cinétique de canaux ioniques, de transporteurs et de récepteurs contrôlant l'excitabilité membranaire.

Par la suite, des modèles de souris mutantes ont été créés en reprenant les gènes candidats mis en évidence dans les familles avec épilepsie-absence,

en particulier les gènes *CLCN2*, *GABRA1A*, *GABRG2*, *CACNAA*, *CACNA1* (Burgess 2006). Ces souris n'expriment que rarement des crises d'absence, ou quand elles les expriment, elles sont associées à d'autres troubles neurologiques (Burgess 2006).

L'ensemble de ces données suggère que la composante génétique des épilepsies-absences humaines est probablement polygénique ce qui rend les modèles génétiques de souris relativement éloignés de la pathologie humaine.

4. Modèle animal choisi dans nos travaux : Le GAERS

Les GAERS constituent une lignée consanguine de rats sélectionnés au début des années 1980, à partir d'une colonie de rats Wistar dont 30% des individus présentent spontanément des crises épileptiques stéréotypées, avec arrêt de l'activité concomitants de DPO rythmiques diffuses sur l'EEG (Danober et al 1998). A partir de la sélection des souches épileptiques, tous les individus de la lignée GAERS expriment à leur tour un seul type de crises stéréotypées non motrices.

- Propriétés cliniques des GAERS

Les GAERS présentent spontanément des crises épileptiques associant: arrêt de l'activité en cours, clonies des vibrisses et hypotonie de la nuque entraînant une chute lente de la tête. L'activité locomotrice interrompue reprend dès que la décharge cesse, sans phase post-critique avec hypotonie (Depaulis 2006). Pendant les crises, les GAERS ne réagissent pas à des stimuli d'intensité standard. En revanche, une stimulation intense pourrait interrompre les décharges (Vergnes et al 1991).

Comme chez l'homme, il existe un intervalle libre entre la naissance et l'apparition des crises chez le GAERS. Elles surviennent vers P30 et prennent un aspect mature sur l'EEG vers P30-40. Leur fréquence augmente progressivement ; seuls 30% des GAERS présentent des crises à P40, alors que le pourcentage atteint 100% à 3 mois (Danober et al 1998). Contrairement à la pathologie humaine, les décharges épileptiques restent présentes jusqu'à la mort de l'animal. Les facteurs favorisant l'apparition

des crises sont identiques aux facteurs retrouvés chez l'homme : les crises sont corrélées à certains états de vigilance, plus fréquentes au cours de l'éveil calme et moins nombreuses lors des phases d'éveil actif, de sommeil lent et de sommeil paradoxal (Danober et al 1998).

- Développement cognitif du GAERS : Apprentissage et comportement

Les capacités sensorimotrices et de socialisation ne sont pas fondamentalement différentes chez le GAERS par rapport à la souche Wistar dont il est issu (Depaulis 2006). Les comportements sexuels ne sont pas modifiés (Vergnes et al 1991). Cependant, la psychose et l'anxiété semblent plus fréquentes que chez les rats non-épileptiques. Les GAERS sont également plus enclins à une hyperactivité motrice (Jones et al 2010). Ces différences sont présentes dès l'âge de 7 semaines, alors que les crises d'absence peuvent ne pas avoir encore débuté, elles ne sont donc pas liées à la répétition des crises (Jones et al 2008).

- Etudes génétiques chez les GAERS

La transmission du phénotype absence chez 100% des GAERS, mâles et femelles, évoque un mode de transmission autosomique dominant (Danober et al 1998). Trois loci localisés sur les chromosomes 4, 7 et 8 ont pu être associés respectivement à la fréquence interne, à l'amplitude et à la sévérité des crises. Malheureusement, aucun locus associé au phénotype absence n'a pu être caractérisé sur les portions de chromosomes humains correspondant à ces loci. Ces données animales, associées aux données génétiques obtenues dans les familles dont plusieurs individus présentent une épilepsie de type idiopathique incluant l'épilepsie-absence, amènent à l'hypothèse que l'épilepsie-absence résulte d'un contrôle polygénique. L'existence de gènes modifiant l'ontogenèse d'un gène dominant muté est à envisagée (Crunelli & Leresche 2002; Danober et al 1998; Depaulis 2006).

- Propriétés électriques de réseaux neuronaux lors des crises d'absence

Les GAERS présentent spontanément des DPO bilatérales et synchrones, à début et fin brusques, de fréquence comprise entre 7 et 11 Hz (Danober et al 1998). Ces décharges sont corrélées dans le temps, à la survenue des

symptômes critiques. La durée moyenne des décharges est de 25 secondes et leur fréquence de récurrence est d'environ 1 par minute (Depaulis 2006).

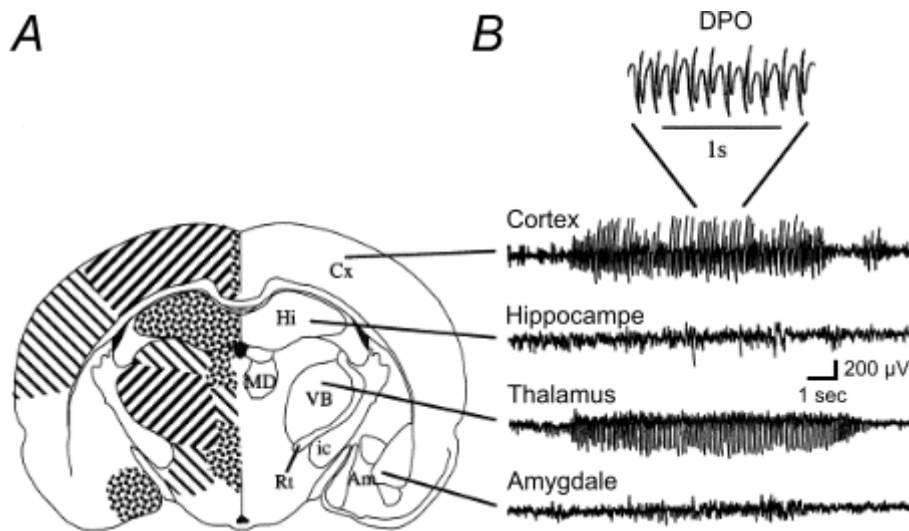


Figure 10 : Localisation des décharges de pointes-ondes chez le GAERS.

A. Localisation des décharges sur une représentation schématique d'une coupe coronale de cerveau de rat. Hachure à droite : décharges de faible amplitude, hachure à gauche : décharges de forte amplitude, pointillés : pas de décharge, en blanc : régions non enregistrées.

B. Enregistrements simultanés, au cours d'une crise, de l'EEG du cortex (Cx), de l'hippocampe (Hi), du noyau ventrobasal du thalamus (VB), et de l'amygdale (Am). En insert : agrandissement de l'enregistrement cortical. Abréviations : ic : capsule interne, MD : noyau médiadorsal du thalamus, Rt : noyau réticulaire du thalamus. D'après Danober, 1998.

Les DPO sont diffuses sur l'ensemble des électrodes corticales, mais prédominent en amplitude dans les régions frontales et pariétales, et dans le thalamus postérolatéral (Danober et al 1998). Les décharges peuvent donc être enregistrées dans le cortex, dans le thalamus ainsi que dans les noyaux gris centraux mais avec une amplitude beaucoup plus faible (figure 10). Elles ne sont pas retrouvées dans l'hippocampe, ni dans les structures limbiques (amygdale, cortex piriforme et cingulaire) (Vergnes et al 1990).

L'intégrité des structures thalamo-corticales est nécessaire au développement des décharges. En effet, l'abolition de l'activité corticale consécutive à l'injection intracorticale de chlorure de potassium ou de tetrodotoxine (bloquant les potentiels d'action et l'activité synaptique) provoque la disparition complète des décharges dans le thalamus (Polack et al 2009; Vergnes & Marescaux 1992). Une lésion bilatérale du thalamus

latéral ou du noyau réticulé fait également disparaître les décharges (McCormick & Contreras 2001; Vergnes & Marescaux 1992).

- Pharmacologie des crises d'absence chez le GAERS

Médicaments anticonvulsivants

La pharmacosensibilité des crises est identique à celle observée dans la pathologie humaine. L'éthosuximide (inhibiteur des canaux calciques), le valproate de sodium et les benzodiazépines (GABA modulateurs) diminuent l'occurrence des crises, la carbamazépine, l'oxcarbazépine et la phénytoïne (inhibiteurs des canaux sodiques) augmentent leur fréquence, quand ils sont administrés par voie générale (Gurbanova et al 2006; Liu et al 2006; Polack & Charpier 2009; Zheng et al 2009). L'effet de la phénytoïne est inversé quand elle est administrée en microinfusion dans le cortex somatosensoriel (Gurbanova et al 2006).

Système GABAergique

Les agonistes GABA_A (muscimol, THIP) ou les GABA-mimétiques (inhibiteurs de la GABA transaminase et inhibiteurs de la recapture du GABA) augmentent la durée des décharges, de façon dose-dépendante (Liu et al 1991). Ils ont l'effet opposé s'ils sont injectés dans le noyau réticulé du thalamus et suppriment alors les crises (Liu et al 1991).

Les agonistes GABA_B (baclofène) augmentent quant à eux la fréquence des crises.

Les antagonistes GABA_A (picrotoxine ou bicuculline) et GABA_B (CGP 35348) diminuent l'incidence des crises (Danober et al 1998; McCormick & Contreras 2001).

Je reviendrai sur le rôle du GABA dans la partie résultats, où le deuxième article concerne les interneurons inhibiteurs corticaux.

Chapitre 1-6 : Origine des crises d'absence

L'épilepsie-absence de l'enfant est un syndrome épileptique dû à une dérégulation de la boucle thalamo-corticale. L'implication des circuits neuronaux corticaux et thalamiques dans l'expression électroclinique des crises d'absence a été démontrée chez l'homme par la présence de décharges électriques à la fois corticales et thalamiques (Williams 1953). De récentes études en imagerie fonctionnelle sont aussi en faveur d'une implication conjointe du thalamus et du cortex lors des crises d'absence ; une hyperactivité métabolique apparaissant dans ces deux structures lors des crises (Labate et al 2005; Laufs et al 2006; Luo et al 2011; Salek-Haddadi et al 2003b). Cependant, le point de départ des décharges au sein de cette boucle thalamo-corticale a été l'objet d'une controverse depuis les années 1950. L'hypothèse initiale était que les décharges naissaient dans la région « centrencéphalique », puis l'hypothèse a évolué vers une origine thalamique (Buzsaki 1991; Morison & Dempsey 1942). Les données actuelles, concernant à la fois les modèles génétiques et les patients, convergent vers l'hypothèse que les décharges ictales sont initialement déclenchées dans un foyer cortical, frontal ou pariétal selon les espèces, puis sont très rapidement généralisées par l'intermédiaire des boucles cortico-thalamo-corticales.

Dans cette partie, j'exposerai les détails des hypothèses historiques, puis j'examinerai les récentes données cliniques et expérimentales démontrant l'origine corticale des décharges en décrivant les mécanismes neuronaux, synaptiques et membranaires, et les mécanismes des circuits pouvant soutenir le déclenchement et le maintien des crises.

1. Historique: de l'hypothèse « centrencéphalique » au thalamus

Les crises d'absence sont caractérisées dans l'EEG par la survenue bilatérale et synchrone de DPO apparemment diffuses d'emblée. Leur site de déclenchement au sein de la boucle thalamo-corticale a été l'objet d'intenses débats, suggérant initialement une origine « centrencéphalique ». En effet, un générateur sous-cortical expliquerait l'atteinte d'emblée bilatérale et symétrique. La théorie centrencéphalique, émise en 1954 par Penfield, propose que les décharges soient issues d'un pacemaker sous-cortical, situé dans le thalamus ou le tronc cérébral, ayant des projections néocorticales diffuses et bilatérales, et dont le rôle serait de coordonner les processus conscients. Le dysfonctionnement de ce système pourrait donc être responsable de la perte de conscience et des décharges généralisées. De plus, des stimulations électriques du thalamus à 3 hertz chez l'animal induisent des décharges bilatérales et synchrones au même rythme que les stimulations et un arrêt comportemental (Hunter & Jasper 1949). Cette hypothèse d'une origine thalamique sera renforcée par des enregistrements intracérébraux pratiqués chez des adultes, puis également chez une enfant porteuse d'une épilepsie-absence pharmacorésistante (Spiegel 1950; Williams 1953). Au cours des absences enregistrées, l'activité rythmique semblait débiter au niveau thalamique tandis que la pointe apparaissait une à deux secondes plus tard au niveau du cortex, puis les deux événements, thalamiques et corticaux, se synchronisaient en une décharge de pointes-ondes à 3 Hz.

En 1991, la théorie d'une « horloge » thalamique propose que ce pacemaker soit en fait le nRT. Les pointes-ondes seraient initiées par la décharge répétée et synchrone d'une petite population de neurones du nRT, qui permettrait le recrutement de neurones thalamo-corticaux (Buzsaki 1991). Le noyau réticulaire imposerait son propre rythme aux circuits thalamo-corticaux (Meeren et al 2005). Par analogie avec les spindles, figures physiologiques du sommeil générées par le thalamus dorsal et modulées par le nRT, dont la morphologie et la fréquence sont proches des DPO de l'épilepsie-absence, il a été suggéré que les DPO naissent également du thalamus (Sitnikova 2010).

Des travaux *in vitro* sur des tranches de thalamus ont ensuite montré qu'une inactivation fonctionnelle des connections synaptiques inhibitrices du nRT par blocage des récepteurs GABA_A est capable de générer une augmentation des décharges de potentiels d'action dans les neurones du nRT, probablement par diminution de l'inhibition réciproque des autres neurones du nRT (figure 14) (Bal 1995; McCormick & Contreras 2001). L'absence de contrôle par feed-back des autres neurones du nRT augmente la durée des décharges. Les neurones du nRT vont alors déclencher des potentiels post-synaptiques inhibiteurs prolongés, médiés par le GABA_B vers les neurones thalamo-corticaux, et générer une hyperpolarisation prolongée des neurones relais permettant de déinactiver un courant calcique à bas seuil (I_T). La repolarisation qui va suivre active le courant I_T qui génère une décharge de potentiels d'action dans les cellules thalamo-corticales, dont les efférences conduisent à une excitation simultanée du cortex et du nRT (figure 14). Cette activité est capable de générer des activités paroxystiques à 3 Hz dans l'ensemble de la boucle thalamo-corticale. La fréquence à 3 Hz est liée aux propriétés endogènes des courants I_T et I_h (Bal 1995; McCormick & Contreras 2001).

Plus récemment, des études pointent le rôle crucial du thalamus dans le déroulement des DPO de l'épilepsie-absence. Chez l'homme, des études en IRM fonctionnelle retrouvent, pendant les DPO, une hyperactivation thalamique, tandis que le cortex est le siège d'une déactivation (Gotman 2005; Labate et al 2005; Salek-Haddadi et al 2003a). Il existe également une augmentation du signal BOLD reflétant l'oxygénation sanguine, dans le thalamus pendant les crises, alors que le cortex apparaît avec une diminution du signal (Hamandi et al 2006; Moeller et al 2010a). Il faut cependant noter que les patients inclus dans ces études ne sont pas homogènes ; ce sont plus fréquemment des adultes que des enfants. Le plus souvent, il ne s'agit donc pas d'épilepsie-absence typique de l'enfant, mais de patients épileptiques qui présentent entre autre, des crises d'absence. L'hétérogénéité de la population peut introduire un biais dans les résultats. Des résultats similaires ont été retrouvés chez l'animal, au cours d'états d'absences prolongés déclenchés par l'injection de Gamma-butyronolactone (précurseur du gamma-hydroxybutyrate ou GHB), proche du GABA (Tenney et al 2004; Tenney et al 2003).

Au total, toutes les études chez l'homme et chez l'animal montrent que les modifications thalamiques existent dans le corps de la décharge, mais aucune de ces études n'a apporté d'argument pour une origine thalamique des DPO.

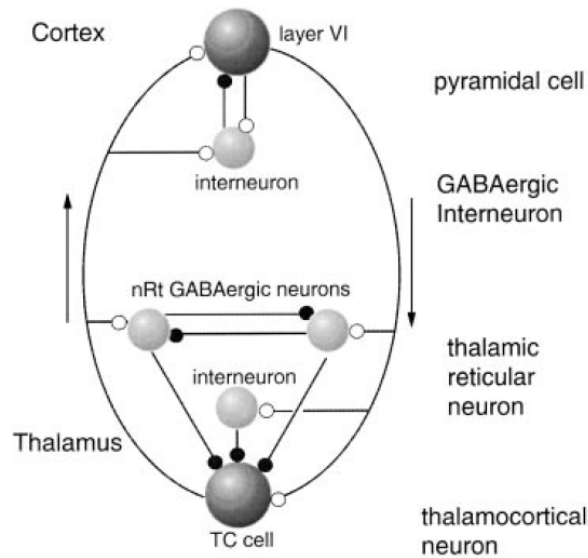


Figure 14 : Diagramme simplifié des interactions thalamo-corticales pouvant sous-tendre la génération des DPO. Les cellules corticales pyramidales et les cellules thalamo-corticales ont des synapses excitatrices (cercles blancs) qui sont régulées par l'activation d'interneurones inhibiteurs GABAergiques dans le nRT (cercles noirs).

2. Vers un consensus cortical ?

Bien que les théories thalamiques et centrencéphalique soient apparemment satisfaisantes sur de nombreux points, notamment en permettant d'expliquer la soudaine généralisation des crises, elles ont été rapidement mises en doute par des expériences conduisant à considérer le cortex comme un acteur indispensable de l'initiation des crises des crises d'absence. En 1953, Bennett réalise des injections d'une drogue proconvulsivante dans l'artère carotide chez des patients souffrant d'épilepsie-absence et déclenche une crise. En revanche, la même injection dans le système vertébro-basilaire (qui perfuse le tronc cérébral et le thalamus), ne produit aucun effet (Bennett 1953). De plus, les tumeurs et/ou lésions au niveau de la région centrencéphalique ne donnent pas lieu

à des crises épileptiques. Les théories physiopathologiques dans l'épilepsie-absence « petit-mal » évoluent alors progressivement vers une hypothèse d'initiation corticale des décharges, avec implication rapide des structures thalamiques.

- Données obtenues dans les modèles animaux en faveur d'une origine corticale

Les théories thalamiques décrites ci-dessus ont probablement permis d'expliquer la généralisation et bilatéralisation des DPO corticales. Mais d'autres travaux réalisés *in vivo* chez l'homme et l'animal ont apporté des éléments contredisant ces théories. Gloor renouvelle l'expérience de Benett et montre, chez des patients et chez des chats, que l'injection de drogue proconvulsivante dans l'artère carotide génère des DPO généralisées alors que l'injection dans l'artère vertébrale ne produit aucun effet (Gloor 1968). De plus, l'application corticale de pénicilline (antagoniste des récepteurs GABA_A) chez le chat génère des DPO rythmiques alors que la même injection au niveau thalamique est sans effet (Gloor et al 1990). Une nouvelle théorie « corticoréticulaire » émerge, privilégiant une interaction entre le cortex et le nRT. Gloor et ses collaborateurs proposèrent que les décharges de pointes-ondes ne soient générées par la boucle thalamo-corticale que lorsque le cortex est dans un état d'hyperexcitabilité. Dans le modèle chat-pénicilline, la présence conjointe du cortex et du thalamus est indispensable pour voir apparaître des crises généralisées, mais celles-ci sont vraisemblablement initiées dans le cortex comme le suggère le fait que les activités paroxystiques ne sont visibles que dans le cortex au cours des premiers cycles de la DPO (Figure 15) (Avoli et al 1983). Le thalamus joue un rôle mal défini mais néanmoins indispensable dans le maintien des activités paroxystiques une fois celles-ci initiées. En effet, dans le corps de la DPO, l'activité de décharge des neurones thalamiques au cours des crises peut tantôt précéder l'activité corticale, tantôt la suivre (voir pour revue (Meeren et al 2005).

L'utilisation des modèles génétiques, en particulier les rats WAG/Rij et les GAERS, a fourni des données électrophysiologiques et pharmacologiques en faveur d'une hypothèse corticale et même de l'existence d'un foyer ictogénique au sein du cortex pariétal. En 2002, les équipes de Fernando

Lopes da Silva et Gilles van Luijtelaar proposent, suite à une analyse originale des signaux EEG corticaux et thalamiques chez les rat WAG/Rij, que les DPO sont initiées dans une région délimitée du cortex puis secondairement généralisées à l'ensemble des circuits corticothalamiques (Meeren et al 2002). En effet, l'analyse par des méthodes mathématiques non-linéaires du degré d'association statistique et du délai temporel entre les activités critiques enregistrées simultanément dans différentes régions corticales et thalamiques révèle que l'activité EEG corticale d'une région restreinte du cortex mène les activités paroxystiques dans les premiers instants de la crise (Meeren et al 2002). Plus spécifiquement, ces analyses non-linéaires de l'association et du délai temporel entre les différentes régions corticales et thalamiques ont montré que l'activité critique de la région péri-orale du cortex somatosensoriel, au cours des 500 premières millisecondes de la crise, précède l'activité des autres zones enregistrées, et permet de prédire l'activité des zones corticales environnantes ainsi que du thalamus. L'analyse des délais temporels entre les signaux paroxystiques enregistrés dans les différentes régions corticales a montré que les activités épileptiques sont initiées au niveau du foyer cortical d'où elles se propagent à la vitesse de 2 m/sec au niveau de l'écorce corticale. Cette vitesse serait compatible avec une propagation des paroxysmes via des circuits synaptiques.

En résumé, le rôle du foyer ictogène est surtout important dans les premiers instants de la crise. En effet, au cours des 500 premières millisecondes de la crise, l'activité du foyer cortical précède systématiquement celle du thalamus. Lorsque la crise est pleinement généralisée, les relations d'association varient suivant les crises entre le cortex et le thalamus, les deux structures pouvant indifféremment contrôler les activités paroxystiques (Meeren et al 2002).

Un autre argument en faveur d'un déclenchement cortical et non thalamique, obtenu chez le GAERS, est l'existence de DPO dans le cortex somatosensoriel sans activités paroxystiques conjointes dans les noyaux thalamiques correspondants (figure 15C) (Polack et al 2007). A l'inverse, aucune décharge localisée uniquement au thalamus sans décharge concomitante dans le cortex n'a pu être enregistrée (Polack et al 2007; Polack et al 2009).

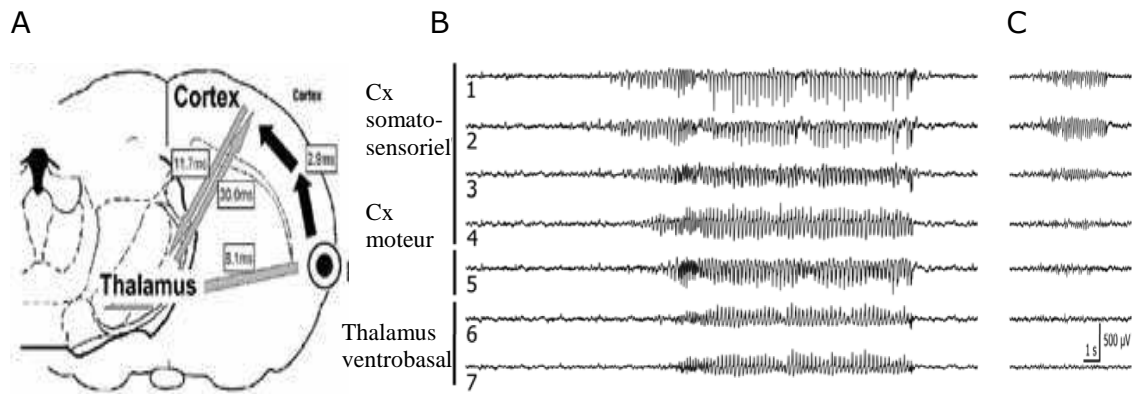


Figure 15 : Origine corticale des crises d'absence.

A gauche, schéma représentant les dynamiques de déclenchement et de propagation des décharges chez les rats WAG/Rij. Modifié d'après (Meeren et al 2005).

A droite, enregistrements EEG corticaux (en haut) et thalamiques (en bas) chez le GAERS. Les portions d'enregistrement à droite du tracé illustrent la survenue isolée de décharges dans le cortex, sans implication thalamique. Cx : cortex et SS : somatosensoriel. D'après (Polack et al 2007).

De manière cohérente avec ces résultats, l'inactivation pharmacologique de ce foyer cortical prévient la survenue des DPO (corticales et thalamiques) alors que le blocage fonctionnel des autres aires corticales ou des noyaux thalamo-corticaux est sans effet sur les décharges épileptiques corticales (Polack et al 2009).

- Les neurones déclencheurs des crises

Les enregistrements EEG, et les expériences de pharmacologie, réalisées chez le GAERS et rat WAG/Rij, ont démontré l'existence dans ces deux souches, d'une zone ictogénique localisée dans la région faciale du cortex somatosensoriel. Des enregistrements intracellulaires dans cette région chez le GAERS a permis d'identifier une population spécifique de neurones à l'origine des DPO (Polack & Charpier 2009; Polack et al 2007; Polack et al 2009). Ces neurones « initiateurs » des crises sont des cellules pyramidales des couches profondes (couches V et VI) du foyer cortical. Elles présentent une hyperactivité spécifique caractérisée au cours des périodes interictales par un potentiel membranaire plus dépolarisé et une décharge de potentiel d'action plus soutenue et plus régulière que : 1/ les neurones des couches plus superficielles de la même région, 2/ les neurones des couches profondes d'autres cortex et 3/ les neurones enregistrés dans les couches profondes du cortex somatosensoriel de rats non épileptiques. Au cours des

crises, les neurones des couches profondes du foyer cortical des GAERS présentent également une hyperactivité et déchargent des potentiels d'action avec chaque complexe pointe onde. Cette décharge de potentiels d'action précède dans le temps celle des neurones des couches plus superficielles du même cortex et des neurones des couches profondes de cortex distants. La comparaison des propriétés électrophysiologiques des différentes populations neuronales enregistrées n'a pas révélé de différences significatives dans l'excitabilité ou les propriétés membranaires intrinsèques pouvant expliquer l'hyperactivité des neurones des couches profondes.

Au cours de la période de transition vers la crise, les potentiels de champ locaux au niveau du foyer montrent que l'initiation des DPO est associée à une augmentation de la puissance spectrale dans la bande de fréquence 9-11 Hz, la fréquence du signal diminuant ensuite vers 6-8 Hz une fois la crise généralisée à l'ensemble du cortex. Ces activités paroxystiques « pré-ictales » sont associées dans la majorité des neurones des couches profondes de ce cortex à des oscillations du potentiel membranaire à la même fréquence (9-11 Hz), supraliminaire pour la décharge de potentiels d'action. La moitié des neurones enregistrés dans les couches profondes présentent également au cours des périodes interictales des oscillations supraliminaire rythmiques du potentiel membranaire autour de 11 Hz bien qu'aucune activité rythmique similaire n'est observée dans l'EEG local.

L'ensemble de ces données suggère que les activités paroxystiques généralisées des crises d'absence résultent de la propagation d'activités oscillatoires à 9-11 Hz initiées par les neurones hyperactifs des couches profondes du foyer cortical. Ces paroxysmes peuvent, par recrutement des neurones voisins, générer des paroxysmes locaux se généralisant ensuite secondairement à la fréquence de 7-8 Hz. Le rôle spécifique de ces neurones dans l'ictogénèse des absences chez le GAERS est supporté par le fait que l'injection d'éthosuximide (médication anti-absence) à des doses thérapeutiques a pour effet d'arrêter les décharges et de réverser l'hyperexcitabilité des neurones ictogéniques (Polack & Charpier 2009).

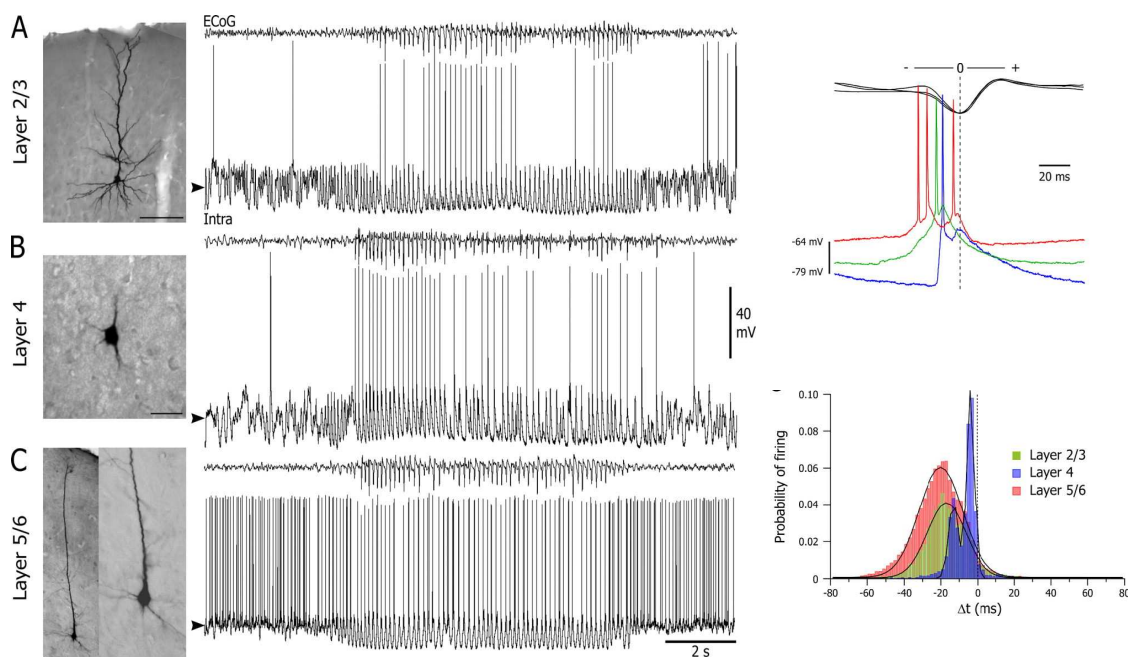


Figure 16 : Propriétés morpho-fonctionnelles des neurones ictogéniques du GAERS.

Microphotographie de 3 neurones pyramidaux situés dans 3 couches corticales différentes au sein du cortex somatosensoriel en tonneaux, accompagnées de leurs enregistrements intracellulaires concomitant des enregistrements EEG en regard du cortex somatosensoriel. En A : les couches superficielles 2/3, en B, la couche 4 et en C, les couches profondes 5/6.

En haut à droite, alignement temporel (en fonction des pointes EEG du foyer, traces du haut) des activités intracellulaires de 3 neurones situés dans 3 couches corticales différentes au sein du cortex somatosensoriel en tonneaux. Le neurone situé dans les couches V/VI débute sa décharge de potentiels d'action avant les neurones des couches superficielles.

En bas à droite, distribution cumulée de la probabilité de décharge des neurones de chaque couche corticale, en période ictale. Le timing 0 correspond à la survenue de la pointe sur l'EEG. D'après (Polack et al 2007).

- Données humaines en faveur d'une origine corticale

Parmi les premiers à remettre en cause l'hypothèse « centrencéphalique », Bancaud et Talairach ont implanté des patients avec des électrodes profondes pour des épilepsies sévères d'allure généralisée (Bancaud 1965). Chez tous les patients enregistrés, ils montrent un point de départ frontal puis une synchronisation bilatérale généralisée sous forme de DPO à 3 Hz. Cette deuxième phase seulement est visible à l'EEG de scalp faisant porter à tort le diagnostic d'épilepsie généralisée. De plus, les crises habituelles décrites par le patient sont déclenchées par la stimulation de la zone corticale épileptogène, tandis que la stimulation thalamique s'avère inefficace. Uniquement en cas de stimulations à fréquence très élevée, des

pointes-ondes peuvent être générées dans tous les noyaux thalamiques ; ces pointes-ondes diffusent à l'ensemble du cortex après une longue latence de 50 ms, en débutant par le cortex frontal homolatéral (Bancaud et al 1965). Bancaud et ses collaborateurs suspectent donc dès 1965, que les crises d'absence débutent dans le cortex frontal méstral en enregistrant des crises d'absence spontanées, et en déclenchant des absences en stimulant cette zone épileptogène (Bancaud et al 1965).

Un peu plus tard, des études montrent des latences de 10-20 ms entre les deux hémisphères, démontrant que la synchronie des décharges épileptiques entre les deux hémisphères n'est qu'apparente (Kobayashi et al 1994; Lemieux & Blume 1986). Ce décalage est en faveur d'un générateur cortical unilatéral, et s'oppose à l'hypothèse d'un générateur central unique responsable d'une diffusion bilatérale et synchrone.

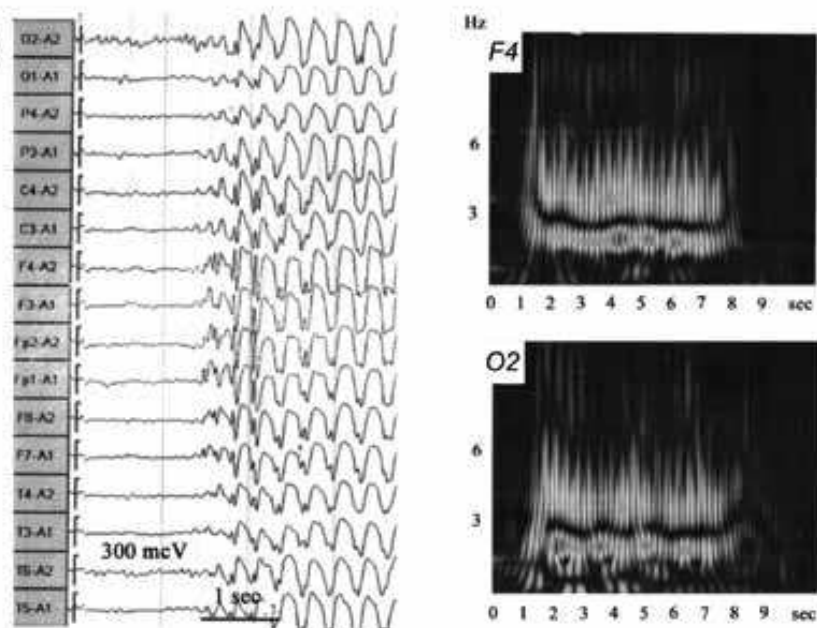


Figure 17 : Prédominance frontale des décharges humaines.

A gauche, décharge débutant par des oscillations précoces en frontal bilatéral, suivies de pointes-ondes de grande amplitude.

A droite, les cartes temps-fréquence indiquent que les oscillations débutent en frontal (F4) avant d'être visible en occipital (O2). Modifié d'après (Bosnyakova et al 2007).

Dans les années 2000, les techniques d'enregistrement et d'analyse du signal progressant, l'EEG en « haute résolution » met en évidence un début des DPO en frontal bilatéral, quelques millisecondes avant d'être visible sur l'ensemble du scalp (Bosnyakova et al 2007) (figure 17). A cette époque,

s'installe définitivement l'hypothèse d'une initiation des crises au sein des cortex frontaux. Le thalamus n'aurait alors qu'un rôle de généralisation de la décharge générée en cortical (Niedermeyer 1996).

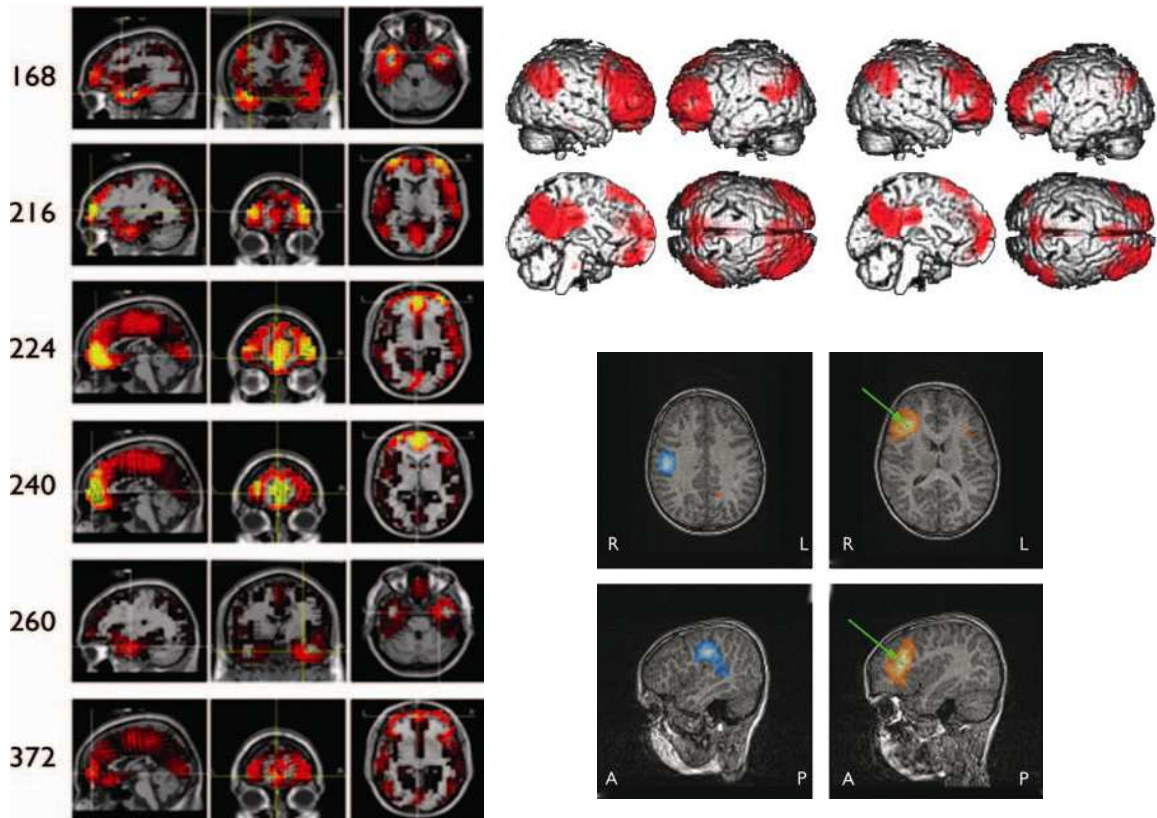


Figure 18 : Topographie de l'initiation des crises d'absence chez l'homme.

A gauche : localisation de source en EEG de haute résolution réalisée à différents décours temporels après le début de la décharge de pointes-ondes. Les chiffres à gauche indiquent ce décours temporel en millisecondes. A noter, la prépondérance des sources dans le cortex ventromédial frontal (224ms) et la propagation de la décharge au sein du lobe frontal. D'après (Holmes 2008).

En haut à droite : Cartographie des changements du signal en IRM, au cours de crises d'absence visible en EEG. Les deux images de gauche sont réalisées avec une IRM 1.5 Tesla et les deux images de droite, avec une IRM 3T. Les aires corticales en rouge sont corrélées négativement en comparaisons multiples. La profondeur cérébrale est rendue par l'intensité de la couleur et sur les coupes axiales pondérées en T1. D'après (Laufs et al 2006).

En bas à droite: Représentation en magnétoencéphalographie, du cortex moteur en bleu, et de l'activation corticale en début de crise chez le même patient. Les activations en magnétoencéphalographie sont superposées sur des coupes en IRM horizontales en haut et sagittale en bas. D'après (Westmijse et al 2009).

Les explorations cérébrales invasives sont actuellement éthiquement interdites chez l'homme dans ce type d'épilepsie idiopathique, il faut donc utiliser des données d'imagerie, d'EEG et de magnétoencéphalographique

(MEG) de scalp. De récentes investigations utilisant ces techniques ont définitivement démontré l'implication du lobe frontal dans la genèse des DPO chez l'homme.

Deux études en magnétoencéphalographie rapportent pour la première, une origine frontocentrale des décharges (Le Van Quyen et al 2006) et pour la deuxième, des associations fortes entre le cortex frontal droit et gauche au moment de l'apparition des décharges, suivies d'activation en frontal latéral et pariétal mésial concomitante des pointes, dans le corps de la décharge (figure 18) (Westmijse et al 2009).

En pré-critique, dans les 10 secondes précédant les crises, une étude en NIRS met en évidence une augmentation systématique de l'oxygénation frontale (Roche-Labarbe et al 2008).

Trois études en EEG haute résolution retrouvent quant à elles une activation frontale mésiale dorsolatérale et orbitofrontale (figure 18) (Holmes et al 2004; Tucker et al 2007) ou une activation préfrontale ictale associée à une inhibition frontale interictale (Clemens et al 2007). Les auteurs font l'hypothèse que cette localisation pourrait expliquer les déficits cognitifs fréquents chez les patients porteurs d'une épilepsie-absence (Clemens et al 2007).

Enfin, les données en IRM fonctionnelle montrent, soit une diminution du métabolisme en frontal et en temporopariétal (figure 18) (Hamandi et al 2006; Laufs et al 2006; Szaflarski et al 2010) concomitante aux décharges, soit une activation frontale orbitale/médiale et pariétale, débutant plusieurs secondes avant le début des crises (Bai et al 2010; Moeller et al 2010a). Dans les études se limitant à des patients homogènes avec des critères plus stricts d'épilepsie-absence, l'activation frontale précède l'activation thalamique ou semble synchrone, avec une topographie un peu différente pour chaque patient (Moeller et al 2010a).

3. Rôle du thalamus dans la « théorie corticale » : maintien des oscillations paroxystiques

Aucune donnée électro-clinique ou d'imagerie métabolique cérébrale chez l'homme ne démontre un déclenchement initial des décharges au sein des

noyaux thalamiques. Ceci est corroboré par les expériences en électrophysiologie et en pharmacologie réalisées chez l'animal. Chez le GAERS, les neurones thalamo-corticaux, notamment ceux se projetant vers le foyer cortical, ont un taux de décharge, durant les périodes critiques et inter-critiques, très inférieur à celui des neurones cortico-thalamiques correspondants (Polack et al 2009). De plus, les potentiels d'action émis par les neurones thalamiques lors des crises sont systématiquement retardés (environ 9 ms) par rapport à ceux des neurones ictogéniques du foyer cortical (Polack et al 2009). Les neurones du noyau réticulaire du thalamus présentent en période ictale, des décharges rythmiques de potentiels d'action en bouffées (Slaght et al 2002a), résultant probablement d'une suractivation des canaux calciques de type T (Tsakiridou et al 1995). Cette hyperactivité des afférences GABAergiques produirait un accroissement de l'inhibition dans les neurones thalamiques, qui serait accrue par un dysfonctionnement dans la recapture synaptique du GABA (Cope et al 2009). Les neurones thalamo-corticaux ont donc lors des crises, une activité rythmique qui n'aurait pas d'effet ictogénique mais qui participerait au maintien des oscillations paroxystiques synchrones dans les boucles cortico-thalamo-corticales lors des décharges. Il semble donc que le thalamus ne déclenche pas les DPO de l'épilepsie-absence, mais qu'il soit responsable de leur maintien et participerait à leur rythmicité.

Le scénario suivant peut donc être proposé. Il est vraisemblable que la faible activité des neurones thalamo-corticaux au cours des DPO (Charpier et al 1999; Paz et al 2007; Pinault 2003; Pinault et al 1998; Timofeev & Steriade 2004) ait pour origine une forte inhibition provenant de la décharge rythmique intense des neurones du nRT (Pinault 2003; Slaght et al 2002b; Timofeev & Steriade 2004) provoquée par les entrées corticothalamique. Cette forte entrée inhibitrice en hyperpolarisant les neurones thalamo-corticaux, active le courant I_h et déinactive le courant calcique à bas seuil (I_T) (Paz et al 2007; Pinault 2003; Polack & Charpier 2006) mais la mise en jeu de ces conductances intrinsèques n'est généralement pas suffisante pour permettre un rebond d'excitation car la fin de la rampe de dépolarisation induite par le courant I_h coïncide temporellement avec un puissant shunt GABA_A. Les décharges de bouffées de potentiels d'action sont générées lorsque les dépolarisations dues au

courant I_h sont associées à des salves de potentiels post-synaptiques excitateurs à haute fréquence qui vont permettre au potentiel membranaire d'atteindre le seuil avant la survenue du shunt (Polack & Charpier 2006; Polack et al 2009). Ces décharges en bouffées vont permettre de renforcer la cohérence des activités oscillatoires dans le cortex et donc de favoriser la synchronie dans les boucles cortico-thalamo-corticales (Paz 2009).

4. Conclusions

L'épilepsie-absence serait donc liée à des déficits fonctionnels dans le cortex et le thalamus, responsables de la genèse et du maintien d'oscillations synchrones anormales entre ces deux structures. Les données les plus récentes convergent vers une hypothèse physiopathologique dans laquelle les neurones corticaux constituent le « déclencheur » de la crise alors que les neurones thalamiques auraient pour fonction de maintenir la décharge rythmique au sein des boucles cortico-thalamo-corticales. Les processus dynamiques initiant les DPO au sein du foyer ictogénique et les mécanismes menant à l'hyperactivité des neurones ictogéniques restent inconnus.

Chapitre 1-7: Objectifs de la thèse et stratégies expérimentales

L'épilepsie-absence typique appartient au groupe syndromique des épilepsies idiopathiques, d'origine génétique multifactorielle, et constitue la forme prototypique des épilepsies généralisées non-convulsives. Son principal symptôme est une rupture de contact qui s'exprime notamment par une altération transitoire des processus perceptifs conscients. Ce trouble de la conscience est temporellement créé par la présence de DPO générées dans les circuits cortico-thalamo-corticaux. De récentes données électrophysiologiques et métaboliques cérébrales, cohérentes chez l'homme et dans divers modèles animaux de cette épilepsie, indiquent que les paroxysmes électriques responsables de la rupture de contact sont initiés dans des zones restreintes du cortex cérébral, se comportant, à l'instar des épilepsies focales, comme de véritables foyers ictogéniques. L'utilisation du GAERS comme modèle expérimental d'épilepsie-absence a permis d'explorer *in vivo*, au cours de crises spontanées, les activités électrophysiologiques cellulaires corticales et thalamiques qui sous-tendent la genèse et l'expression des DPO. Dans le foyer cortical, celles-ci sont constituées d'oscillations rythmiques dépolarisantes générant des bouffées de potentiels d'action corrélées aux DPO de l'EEG de surface, permettant aux activités critiques de se propager et de se généraliser à l'ensemble des circuits cortico-thalamiques. Les mécanismes cellulaires et synaptiques responsables de ces oscillations neuronales pro-épileptiques, ainsi que leurs effets sur le traitement des informations sensorielles, restent inconnus.

Nouvelles questions. Au cours de mes recherches doctorales, motivées par ma formation de neuropédiatre désireuse de mieux comprendre à la fois les mécanismes cellulaires ictogéniques des absences et leurs relations avec les altérations de conscience qu'ils produisent, j'ai abordé deux questions fondamentales jusque là jamais explorées *in vivo*, ni chez l'homme, ni dans les modèles génétiques : 1/ quel est le rôle de l'inhibition synaptique intra-

corticale dans les activités ictogéniques initiant les absences ? et, 2/ comment le cortex cérébral, qui génère les paroxysmes et qui sous-tend les processus sensoriels et cognitifs conscients, traite-t-il les entrées sensorielles issues de l'environnement lors des crises ?

Stratégies expérimentales. Les modèles animaux d'épilepsie sont à l'heure actuelle les seuls qui permettent d'étudier *in vivo*, c'est-à-dire dans des conditions permettant la survenue « naturelle » des crises, les mécanismes cellulaires des processus ictogéniques. De plus, concernant les absences, il ne serait pas « éthique » de proposer une exploration profonde, par stéré EEG ou microélectrodes intracrâniens, des réseaux neuronaux impliqués, dans la mesure où ces crises sont le plus souvent pharmaco-sensibles et guérissent, dans la plupart des cas, spontanément à la puberté. Ainsi, j'ai décidé d'explorer le rôle de l'inhibition GABAergique dans les mécanismes ictogéniques dans le modèle animal utilisé depuis de nombreuses années dans mon laboratoire d'accueil, le GAERS. Ce modèle est celui qui présente le plus d'homologies avec la pathologie humaine et il a été l'objet de nombreuses études concernant les activités neuronales durant les crises. A l'aide d'enregistrements EEG de surface combinés à des enregistrements intracellulaires, j'ai pu rechercher l'existence dans les neurones ictogéniques pyramidaux d'une composante synaptique chlore-dépendante, reflet indirect mais fiable de la mise en jeu des récepteurs GABA_A. Ma stratégie a été de confronter ses potentiels inhibiteurs avec l'activité des interneurones corticaux locaux afin d'établir le profil d'activité des circuits inhibiteurs lors des crises et leur rôle dans le contrôle des décharges ictogéniques. J'ai pris soin d'identifier la typologie et la localisation des neurones enregistrés par des techniques de morphologie cellulaire.

M'appuyant sur ma double formation, en neurologie et épileptologie clinique et en neurophysiologie expérimentale, j'ai pu aborder la question du traitement sensoriel cortical lors des crises chez l'homme et dans le modèle génétique. Ainsi, j'ai mené de front une étude des potentiels évoqués corticaux dans ces deux espèces, utilisant dans les deux cas une modalité sensorielle hautement pertinente d'un point de vue comportemental, le système visuel chez l'enfant et le système des vibrisses

chez le GAERS. Au cours de cette étude translationnelle, ma stratégie a été de comparer les réponses sensorielles corticales obtenues dans trois conditions : au cours et en dehors des crises chez les individus épileptiques et chez les individus non-épileptiques. Appliquant la méthodologie déjà utilisée lors de l'étude précédente chez le GAERS, j'ai pu pour la première fois examiner les corrélats intracellulaires corticaux des réponses sensorielles de surface obtenues lors des crises et les confronter aux différentes situations contrôles. La réalisation en parallèle d'études électrophysiologiques *in vivo* analogues chez l'homme et chez l'animal épileptiques constitue, de mon point de vue, une des approches les plus efficaces pour progresser dans la compréhension des mécanismes et des conséquences physiopathologiques des épilepsies.

Chapitre 2 :

Matériel et Méthodes

1. Méthodologie chez l'animal

- Préparation des animaux

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les directives européennes (directive 86/609/EEC) et toutes les précautions ont été prises pour minimiser le nombre d'animaux utilisés et leur éviter toute souffrance. Les expériences ont été réalisées *in vivo* sur des rats Wistar non épileptiques et des GAERS adultes âgés de 3 à 12 mois (170-380g). Les animaux étaient initialement anesthésiés par des injections intrapéritonéales (i.p.) de pentobarbital sodique (40 mg/kg; Sanofi, Libourne, France) et de kétamine (100 mg/kg; Imalgène, Rhône Mérieux, France) afin de réaliser les procédures chirurgicales. Une canule était introduite dans la trachée afin de placer le rat sous respiration artificielle puis l'animal était placé dans un cadre stéréotaxique (**Horsley-Clarke**). Un anesthésique local (xylocaïne 2%; Astra, France) était injecté en sous-cutané au niveau des incisions du scalp et des points de contention. Tout au long de l'enregistrement, l'analgésie et la sédation étaient maintenue par des injections de fentanyl (3 µg/kg, i.p.; Janssen, France) répétées toutes les 30 min (Charpier et al 1999; Pinault et al 1998; Slaght et al 2004). Dans l'ensemble des expériences, l'activité électrocorticographique (ECoG) de surface était enregistré en continu et des doses supplémentaires de fentanyl étaient injectées de façon à maintenir un tracé d'ondes EcoG caractéristique et stable. Le rythme cardiaque était également enregistré afin de s'assurer de la profondeur de la sédation. Une curarisation par injections intramusculaires de thriéthiodure de gallamine (Sigma, 40 mg i.m.) toutes les 2 heures, permettait une immobilisation complète de l'animal facilitant l'obtention d'enregistrements intracellulaires stables et de longue durée. La température interne du rat était maintenue entre 36 et 37,5 °C grâce à un tapis homéothermique (Harvard Apparatus Ltd, UK). A la fin des

expériences, une dose létale de pentobarbital sodique (200 mg/kg, i.p.) était administrée aux animaux.

- Techniques d'enregistrements

Enregistrements électrocorticographiques

Les enregistrements ECoG étaient obtenus à l'aide d'électrode monopolaire en argent (<0,8 mm de diamètre) de faible résistance ($\approx 60 \text{ k}\Omega$) placées sur la dure-mère, l'électrode de référence étant insérée dans le muscle temporal controlatéral (figure 19). Les enregistrements ECoG étaient réalisés en regard : 1/ du cortex moteur (3 mm d'antériorité par rapport au bregma et 3,3 - 4 mm de latéralité par rapport à la ligne médiane) et, 2/ du cortex somatosensoriel de la face (0-1 mm de postériorité par rapport au bregma et 4-5 mm de latéralité par rapport à la ligne médiane) (Paxinos 1986).

Enregistrements intracellulaires

Les microélectrodes de verre utilisées pour les enregistrements intracellulaires étaient remplies d'une solution d'acétate de potassium (2M, 40-70 M Ω de résistance). Dans quelques expériences (voir Chapitre 3-2), les microélectrodes intracellulaires contenaient du chlorure de potassium (3 M, pH 7,4 ; 20-40 M Ω) afin d'inverser le gradient électrochimique des ions chlorures.

Les enregistrements des neurones du cortex somatosensoriel étaient réalisés à proximité de l'électrode d'ECoG aux coordonnées suivantes : 0.5-1 mm de postériorité par rapport au bregma, 4,5-5,5 mm latéral par rapport à la ligne médiane et 0,9-2,7 mm de profondeur sous la surface corticale (Paxinos 1986). Ces coordonnées anatomiques indiquaient que les enregistrements intracellulaires étaient situés dans les couches profondes V et VI du cortex somatosensoriel S1 de la face, préalablement identifié comme étant le foyer ictogénique des crises d'absence chez le GAERS (Polack et al 2007; Polack et al 2009).

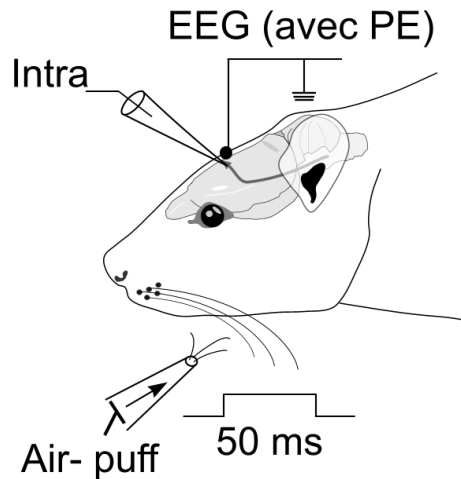


Figure 19 : Représentation schématique du positionnement des électrodes d'enregistrement et de la stimulation sensorielle. L'activité EcoG spontanée ainsi que les potentiels évoqués (PE) en réponse à la stimulation des vibrisses controlatérales (Air-puff) étaient enregistrés à l'aide d'une électrode en argent posée sur la dure-mère en regard du foyer ictogénique localisé dans le cortex somatosensoriel primaire ou en regard du cortex moteur. L'activité intracellulaire des neurones corticaux sous-jacents (Intra) étaient simultanément recueillie.

Les enregistrements intracellulaires ont été obtenus en courant imposé à l'aide d'un amplificateur Axoclamp-2B (Axon Instruments, Union City CA, CA) fonctionnant en mode *bridge*. Les signaux électrophysiologiques enregistrés étaient digitalisés à l'aide d'un convertisseur analogique/digital avec une fréquence d'échantillonnage de 25 kHz (signal intracellulaire) ou de 3 kHz (signal ECoG), puis analysés à l'aide du programme Spike 2 (CED software, Cambridge Electronic Design Ltd, cambridge, UK).

- Stimulations sensorielles

Les stimulations sensorielles utilisées consistaient en des souffles (ou puffs) d'air comprimés de forme rectangulaire délivrés (figure 19) à l'aide d'une unité de contrôle de pression (Picospritzer III, Intracel Ltd, Royston, Herts, UK). Ces puffs d'air étaient appliqués à travers une pipette en verre, d'un diamètre de 1 mm, placée 15 à 25 mm en position rostro-latéral par rapport aux vibrisses. Les puffs d'air, d'une durée de 50 ms, étaient appliqués 20 à 100 fois pour chaque intensité testée (entre 10 et 50 PSI), avec une fréquence basse de 0.24 Hz, afin d'éviter l'apparition d'un phénomène d'habituation des réponses évoquées (Chung 2002). Pour mimer au plus près les stimulations sensorielles naturelles, des stimulations simultanées de plusieurs vibrisses ont été préférées à des stimulations de vibrisses

individuelles. En effet, les stimulations associées de plusieurs vibrisses sont de loin les plus fréquentes lors des comportements d'exploration de l'environnement (Carvell & Simons 1990). La position et l'intensité d'une stimulation sensorielle optimale étaient déterminées, en dehors des DPO, comme étant celles générant un potentiel évoqué sensoriel contralatéral d'amplitude maximale (50-60 μV). Dans ces conditions, un puff d'air produisait une déflexion de 4 à 8 vibrisses avec un angle d'environ 10 degrés.

- Analyse et traitement des données

Le début et la fin des DPO étaient définies, à partir de l'enregistrement EcoG, respectivement comme la première et la dernière pointes rythmiques, d'amplitude au moins deux fois supérieure à celle de l'activité de base. Pour analyser le spectre des fréquences du signal ECoG, des transformées de Fourier étaient appliquées sur des périodes d'au moins 5 secondes, grâce au logiciel Spike2. La latence des réponses sensorielles évoquées au niveau de l'EcoG était calculée comme le délai entre le début du souffle d'air et le premier pic de la réponse évoquée, qui reflète la phase initiale de la réponse synaptique enregistrée dans les neurones corticaux sous-jacents (Pidoux et al 2011).

La valeur moyenne du potentiel de membrane était calculée à partir de périodes d'activité spontanée sous-liminaire d'une durée au moins égale à 10 secondes. La résistance membranaire apparente (ou résistance d'entrée) des neurones corticaux (R_{in}) était évaluée par la mesure du changement de potentiel membranaire moyen à la fin d'échelons de courant hyperpolarisant de faible intensité (0,4 nA, 100-200 ms de durée, toutes les 1.25 sec). La constante de temps de la membrane (τ) était évaluée par le temps nécessaire au potentiel de membrane pour atteindre 63% de sa valeur stable lors de l'injection d'un courant négatif. Le potentiel de pointe de l'électrode était ajusté à zéro millivolt avant l'enregistrement de chaque cellule afin d'obtenir directement la valeur réelle du potentiel transmembranaire. Cette valeur était éventuellement corrigée en utilisant le potentiel de pointe enregistré dans le milieu extracellulaire immédiatement après la fin de l'enregistrement de chaque cellule.

Le seuil de déclenchement des potentiels d'action était mesuré par le niveau de potentiel membranaire pour lequel le rapport $\Delta V/dt$ dépassait $10 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (Mahon et al 2003). L'amplitude des potentiels d'action était définie comme la différence de potentiel entre le seuil de déclenchement et le sommet du potentiel d'action. La durée totale des potentiels d'action était mesurée entre le seuil de déclenchement et le retour à la même valeur de potentiel. Les neurones dont le potentiel d'action était d'amplitude inférieure à 50 mV n'ont pas été inclus dans les études.

La latence de la réponse des neurones aux stimulations sensorielles était mesurée du début du puff d'air au pied de la réponse évoquée. L'amplitude des réponses synaptiques infraliminaires était définie comme la différence de potentiel entre le pied et le pic de la réponse évoquée. La latence des potentiels d'action évoqués sur les réponses synaptiques était le délai entre le début du stimulus et le pic du potentiel d'action. La probabilité de décharge des neurones en réponse aux stimulations était calculée comme le rapport entre le nombre de réponses supraliminaires et le nombre total des réponses évoquées. Les régressions des distributions de valeurs numériques par des fonctions mathématiques étaient réalisées à l'aide du logiciel Origin 7.5 (Microcal software Inc, Northampton, MA, USA).

- Analyse statistique

Les valeurs numériques sont exprimées en moyenne \pm erreur standard à la moyenne (sem). Le seuil de significativité a été établi en utilisant de façon appropriée les tests de Student, de Mann-Whitney et l'analyse de variance « one-way » ANOVA. L'ensemble des tests statistiques a été réalisé grâce au logiciel SigmaStat 3.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2. Méthodologie chez l'homme

Tous les enregistrements et protocoles réalisés chez l'homme ont approuvés par le Comité d'Éthique local.

- Enregistrements EEG

J'ai enregistré des enfants porteurs d'une épilepsie-absence et des enfants contrôles non-épileptiques. Les enregistrements EEG d'une durée minimale de 30 mn, comportaient au moins 2 périodes d'hyperventilation de façon à déclencher des crises d'absence dans le groupe des enfants épileptiques (Hirsch 2005). Les électrodes étaient au nombre de 21, disposées selon le système 10-20 international. L'EEG était enregistré en référence moyenne. Le signal était amplifié 1000 fois, filtré dans la bande passante 0.05 et 97 Hz, et acquis avec une fréquence d'échantillonnage de 256 Hz. Les systèmes d'enregistrements étaient Deltamed Natus (San Carlo, USA) et Micromed system (Mogliano Veneto, Italy).

- Stimulations sensorielles

J'ai choisi d'appliquer des stimulations lumineuses par flash lumineux, le système visuel étant la voie sensorielle préférentiellement utilisée lors des interactions de l'homme avec son environnement (Rees et al 2002). Les stimulations étaient délivrées par un photostimulateur standard positionné à une distance de 25 cm devant les yeux. Des flashes lumineux de 100 ms et 800 lux étaient appliqués automatiquement au cours des 2 périodes d'hyperpnées, à la fréquence de 2 Hz. Cette fréquence basse a été choisie pour permettre l'obtention d'une période d'analyse de 300 ms après chaque stimulation incluant la latence attendue des potentiels évoqués visuels. Dans les périodes intercritiques et chez les sujets témoins, au moins trente stimuli ont été appliqués. Le nombre de stimulations lumineuses délivrées pendant les DPO varie d'un enfant à l'autre, en fonction de la durée et du nombre de ces décharges (en moyenne 52 stimulations lumineuses ont été appliquées, avec un nombre minimal à 10 et maximal à 103).

- Analyse des données

Nous avons sélectionné et analysé les segments EEG dépourvus d'artéfacts. Des moyennages individuels ont été réalisés pour chaque électrode, en référence moyenne, pendant et en dehors des décharges ictales. L'analyse a ensuite été orientée vers le cortex occipital (O1 et O2), source maximale des potentiels évoqués visuels (Pastor et al 2007; Vialatte et al 2010). La latence des potentiels évoqués a été calculée comme le délai entre le début du stimulus et le pic de la réponse. De plus, pour être certain du lien de cause à effet entre la stimulation lumineuse et le potentiel observé, des moyennages aléatoires, sans stimulation lumineuse, ont également été réalisés dans les 3 conditions (interictal, ictal et chez les témoins).

Chapitre 3-1:

Persistance du traitement sensoriel cortical durant les crises d'absence : Etude électrophysiologique multi-espèces et multi- échelles

Article 1: Persistence of cortical sensory Processing during Absence Seizures: Evidence from EEG and Intracellular Recordings in Human and an animal model

M. Chipaux, L. Vercueil, A. Kaminska, S. Mahon, S. Charpier

Soumission à PLOS One en Octobre 2012

Rappels sur le contexte de la recherche

Les crises d'absence se manifestent principalement par des ruptures de contact avec l'environnement, durant lesquelles le patient ne peut répondre aux stimulations sensorielles et qu'il ne peut se remémorer après la période critique. Bien que ces crises soient incluses parmi les syndromes épileptiques généralisés dans la classification internationale des épilepsies, les techniques d'EEG et d'imagerie cérébrale les plus récentes montrent un dysfonctionnement cortical focal préalable à la généralisation des paroxysmes. Ces anomalies précoces dans les signaux électriques et métaboliques prédominent au niveau des cortex frontaux ((Holmes et al 2004; Sadleir et al 2006; Westmijse et al 2009). Dans les modèles animaux génétiques de l'épilepsie-absence les plus proches de la pathologie humaine, et notamment les GAERS et les rats WAG-Rij (Danover et al 1998; Depaulis 2006), les explorations électrophysiologiques montrent des résultats comparables dans une autre zone du manteau cortical. Toutes les données expérimentales *in vivo* obtenues dans ces deux lignées de rats épileptiques sont cohérentes, et montrent que les DPO dans les circuits thalamo-corticaux ont un début focal au sein du cortex somatosensoriel de la face (Meeren et al 2005; Polack et al 2007; Polack et al 2009). Les oscillations paroxystiques se propagent au sein des réseaux synaptiques et

envahissent les boucles cortico-thalamo-corticales assurant ainsi la généralisation et le maintien des DPO pendant la durée de la crise (Meeren et al 2005; Timofeev & Steriade 2004). La présence d'oscillations synchrones intenses dans les boucles cortico-sous-corticales, associée à la fonction attribuée aux noyaux thalamo-corticaux de transférer les informations sensorielles exclusivement lors du « mode tonique », a conduit à l'hypothèse, restée longtemps dominante, que l'interruption des perceptions conscientes lors des absences résultent d'un filtrage des entrées sensorielles lors du « mode oscillatoire » thalamique [Steriade et al 1993; Steriade 2000, Timofeev & Steriade 2004; Kostopoulos 2001; Llinás & Steriade 2006 ; Paz et al 2009]. Mais qu'en est-il exactement des troubles de la conscience chez les patients et les rats atteints d'épilepsie-absence ?

Cliniquement, la rupture de contact avec l'environnement est associée à un arrêt de l'activité en cours avec fixité oculaire et absence de réponses aux sollicitations extérieures. Le patient garde une amnésie des événements survenus pendant la crise (Panayiotopoulos 2008; Panayiotopoulos et al 1997). Cependant, la profondeur de la rupture de contact est différente d'un patient à l'autre et peut varier en gravité d'une crise à l'autre chez le même patient (Blumenfeld 2005). La situation est donc plus complexe et cette altération de la conscience pourrait être liée à des déficits transitoires incluant les mécanismes attentionnels ou l'intégration de l'information sensorielle (selon l'hypothèse citée ci-dessus) et/ou à l'incapacité à produire une expérience consciente à partir de l'information extérieure (Blumenfeld 2005; Kostopoulos 2001). Jung en 1939 a montré que les DPO associées aux crises d'absence pouvaient être interrompues par des stimuli auditifs puissants ou par des stimulations douloureuses. Plus récemment, il a été montré que les patients porteurs d'une épilepsie-absence peuvent présenter, en dehors des crises, des déficits cognitifs spécifiques impliquant principalement l'attention soutenue visuelle ou auditive (Duncan et al 2009). Enfin, il a été montré une atténuation de l'onde corticale P300 du potentiel évoqué visuel (PEV) chez les patients porteurs d'une épilepsie-absence, en période intercritique, comparé aux sujets non-épileptiques (Duncan et al 2009). Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'absence de réactivité au cours des crises d'absence était due à une altération de l'intégration sensorielle ou à une dysfonction

transitoire des mécanismes d'attention (Duncan et al 2009). La seule publication visant à déterminer si les stimuli sensoriels pouvaient être traités par le cortex en période ictale comportait un faible nombre de sujets et n'a pas permis de mettre en évidence de manière solide une modification des PEV corticaux (Orren 1978). Des études combinant EEG et IRM fonctionnelle chez des patients et dans divers modèles animaux supportent une hypothèse plus complexe et « dynamique » selon laquelle les altérations de la conscience résultent d'un dysfonctionnement dans les relations fonctionnelles entre les aires associatives bilatérales et les structures sous-corticales avec lesquelles elles sont interconnectées (Blumenfeld 2003, 2005; Cavanna & Monaco 2009).

Les troubles de la conscience chez le GAERS, difficile à évaluer objectivement en raison de la barrière interspèce, sont moins documentés. Néanmoins, il a été montré que, conformément à la symptomatologie humaine, les réponses des GAERS à des stimuli de faible intensité étaient abolies lors des crises et que leur performance lors de tâches d'apprentissages instrumentaux était considérablement réduite si le stimulus sensoriel conditionnant était concomitant d'une crise (Danober et al 1998, Getova et al.1997, Vergnes et al., 1991).

But spécifique de l'étude

Notre étude avait pour but, pour la première fois chez l'homme et le GAERS, d'analyser et de comparer les réponses corticales (potentiels évoqués de surface) à des stimuli sensoriels dans trois conditions : chez le sujet sain, chez l'individu épileptique en dehors des crises (condition interictale) et lors des crises (condition ictale) Pour la première fois aussi, l'utilisation du GAERS a permis d'analyser ces réponses à l'échelle intracellulaire, c'est-à-dire de déterminer au niveau synaptique l'effet des perturbations environnementales durant les absences.

Nous avons ainsi comparé les caractéristiques des PEV corticaux, en période ictale et interictale chez des enfants porteurs d'une épilepsie-absence typique pharmaco-résistante, puis chez des enfants sains, en appliquant des stimulations lumineuses intermittentes (Pastor et al 2007; Vialatte et al 2010). Dans un deuxième temps, nous avons analysé chez les GAERS, les potentiels évoqués à la surface du cortex somatosensoriel, ainsi

que les réponses intracellulaires sous-jacentes, après application de souffles d'air sur les vibrisses controlatérales (Pidoux et al 2011). Les enregistrements neuronaux ont été réalisés dans les couches profondes du cortex somatosensoriel de la face, au sein de la population neuronale préalablement déterminée comme étant le générateur des DPO dans cette espèce (Polack et al, 2007 ; 2009). Nous avons comparé les réponses obtenues en périodes ictale et interictale chez le GAERS avec celles recueillies dans les régions et neurones corticaux homologues chez le rat normal.

Principaux résultats

Chez les patients épileptiques, les PEV persistent pendant les crises en regard du cortex occipital. Leur amplitude en période ictale est significativement accrue en comparaison de la période interictale et leur latence diminue par rapport aux sujets sains. Chez le GAERS et le rat non-épileptique, nous avons réalisé des enregistrements EEG *in vivo* du cortex somatosensoriel de la face (zone épileptogénique) combinés à des enregistrements intracellulaires des neurones pyramidaux sous-jacents. Nous avons d'abord montré que les PE corticaux évoqués par des déflexions des vibrisses controlatérales ne sont pas significativement modifiés entre les situations ictales et interictales chez le GAERS et en comparaison avec le rat normal. Cependant, les réponses synaptiques sous-liminaires ont une amplitude significativement augmentée pendant les crises, comparées aux périodes interictales correspondantes.

Conclusions

Nos résultats obtenus chez l'homme et l'animal sont donc partiellement convergents et démontrent la persistance des réponses corticales aux stimulations sensorielles pendant les crises absence. De plus, admettant des processus intégratifs similaires chez les deux espèces, la majoration des réponses synaptiques sous-liminaires lors des crises (démonstré chez le GAERS) pourrait expliquer l'amplification des PEV chez l'enfant au cours des crises. Le cortex cérébral, et donc les circuits thalamo-corticaux qui véhiculent l'information, seraient donc capable d'intégrer un stimulus extérieur lors des crises et de réaliser une trace neurophysiologique dans

les régions cérébrales appropriées. Ces résultats vont donc à l'encontre de l'hypothèse que les oscillations synchronisées dans la boucle thalamo-corticale oblitérent les processus de perception consciente en filtrant les événements sensoriels ou en détournant les informations vers des aires corticales inappropriées (Kostopoulos 2001; Llinas & Steriade 2006; Steriade 1990; Steriade 2000; Timofeev & Steriade 2004).

Cependant, les PE corticaux, apparemment normaux ou même amplifiés, sont incapables de produire une expérience consciente. L'interruption de la perception consciente du stimulus pendant les crises d'absence ne serait donc pas due à la non-intégration de l'information au niveau des aires corticales, mais résulterait d'un dysfonctionnement en aval ou d'un désordre plus global. Différentes hypothèses peuvent être envisagées : 1/ une interférence négative entre le timing de la réponse sensorielle et l'événement oscillatoire cortical, tel que a été envisagé pour le sommeil lent (Dang-Vu et al 2011; Schabus et al 2012), 2/ une dissociation fonctionnelle entre les aires associatives frontales latérales et pariétales (Blumenfeld 2003, 2005; Cavanna & Monaco 2009) ou, 3/ une compétition temporelle entre le PE et la pointe EEG interrompant le délai requis pour qu'une réponse sensorielle corticale puisse produire une expérience subjective (Libet et al, 1967, 1972) Ces points délicats de discussion sont développés dans l'article présenté ci-après et dans la discussion générale de cette thèse.

Persistence of Cortical Sensory Processing during Absence Seizures: Evidence from EEG and Intracellular Recordings in Human and an Animal Model

Mathilde Chipaux^{1,2}, Laurent Vercueil³, Anna Kaminska⁴, Séverine M. Mahon¹✉, Stéphane Charpier^{1,5,*}✉

¹Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, UPMC/INSERM

UMR-S 975; CNRS UMR 7225, Hôpital Pitié-Salpêtrière, F-75013, Paris, France

²Pediatric Neurosurgery Unit, Fondation Ophthalmologique A. de Rothschild, Paris, France

³Grenoble Institute of Neurosciences, Centre de Recherche INSERM U 836-UJF-CEA-CHU, Equipe 9, Grenoble, France

⁴AP-HP, Service d'explorations fonctionnelles, laboratoire de neurophysiologie clinique, hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France

⁵UPMC University Paris 06, F-75005, Paris, France

✉ These authors contributed equally to the supervision of the work.

*Corresponding author: E-mail: stephane.charpier@upmc.fr

Abstract

Absence seizures are caused by brief periods of abnormal synchronized oscillations in the thalamocortical loops, resulting in widespread spike-and-wave discharges (SWDs) in the electroencephalogram (EEG). SWDs are concomitant with a complete or partial impairment of consciousness, notably expressed by an interruption of ongoing behaviour together with a lack of conscious perception of external stimuli. It is largely considered that the paroxysmal synchronizations during the epileptic episode transiently render the thalamocortical system incapable of transmitting primary sensory information to the cortex. Here, we examined in young patients and in the Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS), a well-established genetic model of absence epilepsy, how sensory inputs are processed in the related cortical areas during SWDs. In epileptic patients, visual event-related potentials (ERPs) were still present in the occipital EEG when the stimuli were delivered during seizures, with a significant increase in amplitude compared to interictal periods and a decrease in latency compared to that measured from non-epileptic subjects. Using simultaneous *in vivo* EEG and intracellular recordings from the primary somatosensory cortex of GAERS and non-epileptic rats, we found that ERPs and firing responses of related pyramidal neurons to whiskers deflection were not significantly modified during SWDs. However, the intracellular subthreshold synaptic responses in somatosensory cortical neurons during seizures had larger amplitude compared to quiescent situations. These convergent findings from human patients and a rodent genetic model demonstrate the persistence of cortical responses to sensory stimulations during SWDs, indicating that the brain can still process external stimuli during absence seizures. They further suggest that the disruption of conscious perception during absences is not due to an obliteration of information transfer in the thalamocortical system but rather results from a time-dependent interference between cortical response and upcoming epileptic event or a transient alteration of large-scale brain dynamics.

Introduction

The cardinal clinical symptom of absence epilepsy, which mostly occurs during childhood, is a transient impairment of consciousness [1-4]. These episodes of altered consciousness are temporally correlated with cycles of abnormal synchronous neural activity that involve the thalamocortical loops of the two hemispheres, resulting in bilateral 3–4 Hz spike-and-wave discharges (SWDs) in the cortical and thalamic electroencephalograms (EEGs) [3,5,6] (see **Figure 1A**). Although absence seizures are still classified as generalized seizures [7], EEG and magnetoencephalographic investigations from young patients demonstrated that SWDs are predominant over the frontal cortex during the epileptic episode [8,9], and the involvement of specific left and/or right frontal regions at the onset of cortical paroxysms [10-12]. Consistently, a cortical focal initiation of SWDs has been found in rodent genetic models, such as the Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) and the WAG/Rij rats, which closely phenocopy the human absence seizures [13,14]. In these two rat strains, SWDs are initiated from the facial somatosensory cortex [15-19], due to the hyperactivity and early paroxysmal discharges of the deep-layer pyramidal neurons [17,18,20] (see **Figure 3B2 & 3B3**). These congruent findings in human and animal models led to the assumption that SWDs are generated within discrete cortical areas, and then rapidly propagate through the cortical networks and cortico-thalamo-cortical loops, allowing the maintenance of synchronized oscillations between cortex and thalamus during the seizure [16,21,22].

During a typical human absence, the disruption of conscious processes takes the form of a sudden arrest of ongoing behavior together with staring and unresponsiveness to environmental demand, with no recall afterwards of the epileptic attack [1-4]. However, the degree of consciousness impairment is highly variable between patients and even from one seizure to the next for the same subject, depending notably upon the duration of the epileptic episode and the amplitude of EEG paroxysms [4,23,24]. The alteration of both the level of general awareness and consciousness contents could originate from various and non-exclusive neurophysiological defects, including a loss of attention mechanisms, an altered sensory integration or a global inability of cortical and subcortical networks to process information and produce conscious experience [1,4,25,26]. Pioneering studies during the 1930s have shown that patients do not respond to mild visual or auditive stimuli, which will remain unremembered, whereas loud noises or pain stimuli abolish the SWD simultaneously with a recovery of consciousness [23,27]. More recently, it has been found that patients with absence epilepsy display severe deficiency on tests of visual or auditive sustained attention compared to healthy or complex focal seizures patients [24,28-30]. The break-up in visually-guided behaviors was correlated with a complete loss or pronounced attenuation of visually-evoked cortical potentials when recorded during [31] or in between [29] SWDs. These correlated behavioral and electrophysiological defects led to the two undecidable hypotheses that attenuated responsiveness during an absence was due to an altered sensory processing or a temporary dysfunction in the central attentional mechanisms [24,29]. Alternatively, recent combined EEG and functional magnetic resonance imaging (fMRI) studies suggested that loss of consciousness during absence seizures was rather caused by a disruption of the normal information processing in specific bilateral association cortices and related subcortical structures [1,4,26,32] (see Discussion).

Due to their strong homology with the human disease, rodent genetic models of absence epilepsy became a powerful experimental tool to investigate the basic pathophysiological mechanisms of absence seizures [13,14,22,33]. In addition to spontaneously recurrent and bilateral SWDs in the cortex and thalamus, which are sensitive to anti-absence treatments, these rat strains exhibit during electrical paroxysms behavioral abnormalities that closely resemble the human absence [13,14,34]. In the GAERS, SWDs, which start and end abruptly on a normal background EEG, are concomitant with behavioral immobility and rhythmic twitching of the vibrissae and facial muscles [13]. As in patients with typical absence epilepsy, GAERS do not display other neurological defects and do not show any modification in their spontaneous motor activity, exploration, feeding or social interactions, compared to non-epileptic rats [13,35]. As in human patients, the responsiveness to mild sensory stimuli is abolished during SWDs and the performance on instrumental learning tasks is considerably impaired when the conditioning sensory stimulus coincides with the occurrence of cortical paroxysms [13,35,36].

The unique investigation in patients aimed at determining whether external sensory inputs can access and be processed in cortical networks during absence seizures was unsuccessful, possibly due to the small number of tested subjects and the use of rudimentary analyses [31]. Here, we first quantify, in young patients with drug-resistant typical absence and in the GAERS, the properties of surface event-related potentials (ERPs) recorded from the cortical areas related to the stimulated sensory channels. In epileptic patients and healthy human subjects, intermittent flash light stimulations [37,38] were

applied and occipital ERPs were averaged and measured. In GAERS, we further examined the sensory integration during SWDs by making combined EEG and intracellular recordings from the facial part of the somatosensory cortex and analyzing the surface and intracellular responses to air-puff stimulations applied to the contralateral whiskers [39]. In both species, ERPs and/or intracellular responses evoked during SWDs were compared to those obtained during interictal periods and during normal cortical activities from non-epileptic subjects.

Materials and Methods

Human recordings

This study followed the principles of Declaration of Helsinki for human subject protection, and the protocols were approved by the local Ethical Committee. Written informed consent from the parents and written assent from the children were acquired for each participant.

Patients. We recorded 13 children with drug-resistant typical childhood absence-epilepsy, in accordance with the International League Against Epilepsy criteria [40], and 7 healthy control children. Epileptic and control children were studied in four neuropsychiatric units in France: Necker Enfants-Malades, Paris; Rothschild Foundation, Paris; Grenoble University Hospital and Lille University Hospital. Children were video monitored, notably to ensure that SWDs were concomitant with absences. Exclusion criteria were visual disorders, other epilepsies than childhood absence-epilepsy, neurological disease, mental retardation, abnormal brain imaging and history of photically induced seizures.

EEG recordings. Each EEG recording, lasting at least 30 min, contained 2 periods (≥ 3 minutes) of hyperventilation in order to trigger absences in epileptic children [41]. Twenty-one scalp electrodes were positioned according to the classical 10–20 system [42]. The EEG was recorded with an average reference. Signals were amplified (1000 times), filtered at 0.05 to 97 Hz and acquired at 256 Hz using the Deltamed Natus (San Carlo, USA) or Micromed system (Mogliano Veneto, Italy).

Sensory stimulations. We chose to apply photic stimulations because the visual system provides the main sensory channel involved in perceptual consciousness in human [43]. Stimulations were given with a standard photostimulator positioned at a distance of 25 cm from the eyes. Direct flashes (800 lux during 100 ms) were automatically applied at 2 Hz during 2 hyperpnoea periods lasting at least 3 minutes. The 2-Hz frequency was chosen to allow an analysis period of 300 ms after each stimulation, including the latency of the cortical visually-evoked ERP (vERP). At least 30 stimuli were delivered during interictal periods and baseline activity in healthy subjects.

Data analysis. EEG segments with visual stimulation were manually selected to discard the periods contaminated by muscular artifacts. Averaging of successive individual responses was performed for each electrode with mean reference, during both ictal and interictal periods. We focused our analysis on occipital (O1 and O2) records because vERPs with maximal amplitude were located at occipital sites [37,38] (**Figure 1C2, inset**). Latency of vERPs was calculated as the time between the onset of the flash and the peak of the sensory response. Random averaging ($n = 100$ trials) were made from interictal and ictal periods in epileptic children, and from control activity in non-epileptic subjects, to assess the possible participation of spontaneous EEG waves in the averaged sensory-evoked responses. The color-coded spatial representation of

the maximum amplitude of vERPs was performed using Micromed software (Mogliano Veneto, Italy).

Animal experiments

All animal experiments were performed in accordance with local Ethical Committee and European Union guidelines (directive 86/609/EEC), and every precaution was taken to minimize stress and the number of animals used in each series of experiments.

Animal preparation for in vivo EEG and intracellular recordings. Electrophysiological recordings were performed *in vivo* from three- to ten-month-old GAERS (n = 11) and non-epileptic adult Wistar rats (n = 11) (Charles River, L'Arbresle, France). Detailed procedures of anesthesia and surgery are described in details elsewhere [17,18,20]. Briefly, anesthesia was first induced with intraperitoneal (i.p.) injection of sodium pentobarbital (40 mg/kg body weight) and ketamine (50 mg/kg body weight) for surgery procedures. Animals were then artificially ventilated after immobilization by gallamine triethiodide (40 mg i.m. every 2 h). Sedation and analgesia was maintained throughout the recording sessions by repeated injections of fentanyl (3 µg/kg body weight, i.p.) allowing the spontaneous occurrence of SWDs on a waking-like background EEG activity [17,18,44]. Body temperature was maintained (36.5–37.5°C) with a homoeothermic blanket. At the end of the experiments, animals received an overdose of sodium pentobarbital (200 mg/kg body weight, i.p.).

Electrophysiological recordings. Spontaneous EEG activity and surface ERPs (**Figure 2A-D**) evoked by contralateral stimulations of whiskers (wERPs) were recorded with a low impedance ($\square 60$ k Ω) silver electrode placed on the dura above the facial region of the primary somatosensory (S1) cortex [45] at the following coordinates: 0 to -1.5 mm posterior to the bregma and from 4 to 5.5 mm lateral to the midline. The reference electrode was placed in a muscle on the opposite side of the head.

Intracellular recordings were performed using glass micropipettes filled with 2 M potassium acetate (50–80 M \square). Neurons recorded from GAERS and control Wistar rats were located within the same region of the S1 cortex (**Figure 3A1 & 3B1**) and close to (< 500 \square m) the surface EEG electrode, at the following stereotaxic coordinates: -0.5 to -1.0 mm posterior to the bregma, 3.8–5.5 mm lateral to the midline, and 904–2713 µm under the cortical surface. These anatomical coordinates indicated that intracellularly recorded cells were located in the deep layers of the S1 cortex area previously identified as the cortical trigger for absence seizures in the GAERS [17,18].

Sensory stimulations. Sensory stimulations, consisting in puffs of compressed air delivered by a pressure device (Picospritzer III, Intracel Ltd, Royston, Herts, UK), were applied through a 1mm diameter glass pipette placed 15–25 mm rostralateral from the whiskers. Square air puffs (50 ms duration) were given 20–100 times for each intensity tested (ranging between 10 and 50 p.s.i.) with a low frequency (0.24 Hz) to prevent adaptation of whisker-evoked responses [46]. To closely replicate natural sensory stimulations, multi-whisker stimulations were preferred to single whisker stimulations as they are more likely to occur during exploratory behavior [47,48]. The intensity of optimal sensory stimulus was determined, in absence of epileptic discharge as the minimal air-puff pressure generating a contralateral ERP of maximal amplitude (40–60 µV). Under these conditions, the air-puff stimuli deflected 4–8 whiskers by $\square 10$ deg.

Data acquisition and analysis. Electrophysiological signals were digitized and stored on-line with a sampling rate of 25 kHz (intracellular recordings) or 3

kHz (EEG, ERP). Intracellular recordings were obtained under current-clamp conditions using the active bridge mode of an Axoclamp-2B amplifier (Axon Instruments, Union City CA, USA).

The start and end of a SWD in the GAERS EEG were taken to be the first and last spike component, respectively, where the size of the spike was at least two times the peak-to-peak amplitude of the baseline EEG. To perform spectral analysis of EEG potentials (over a period of at least 5 s), fast Fourier transforms were applied using Spike2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge).

The value of neuronal membrane potential was calculated as the mean of the distribution of spontaneous subthreshold activity (>10s duration). The membrane potential values were eventually corrected when a tip potential was recorded after termination of the intracellular recording. Apparent membrane input resistance of cortical neurons was measured by the mean ($n = 20$) membrane potential change at the end of hyperpolarizing current pulses of -0.4 nA. The membrane time constant was derived from an exponential decay fit applied to the current-induced hyperpolarization. Neurons with action potentials having an amplitude < 50 mV were not included in the database. Voltage threshold of action potentials was measured as the membrane potential at which the dV/dt first exceeded 10 V.s^{-1} [49].

In GAERS and control Wistar rats, the latency of wERPs, in presence and in absence of epileptic discharges, was measured as the time between the onset of the air-puff stimulus and the peak of the first negative component of the surface cortical response, which reflects the initial synaptic population response in the underlying cortical network [39,50]. The latency of the corresponding intracellular responses was calculated as the time between the onset of the air-puff stimulus and the foot of the evoked potential. Neuronal events having a shape (rising and decay phases) and/or latency that did not match those of the mean synaptic response obtained after averaging of all trials applied in the same condition (with or without SWDs) were not considered as induced by the whisker stimulation and discarded [39]. The amplitude of individual sensory-evoked subthreshold potentials was measured as the voltage difference between the membrane potential at the foot and the peak of the response. Latency of evoked spikes on suprathreshold synaptic responses was the time between the start of the sensory stimulus and the peak of the spike waveform. The firing probability of neurons in response to whisker deflections was calculated as the ratio between the number of suprathreshold synaptic responses and the total number of sensory-evoked responses.

Statistical analysis

Numerical values are given as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significances were assessed using unpaired two-tailed Student's t tests, one-way ANOVA, or the non-parametric Mann-Whitney rank sum test and Kruskal-Wallis ANOVA on ranks. Statistical analyses were performed with SigmaStat 3.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Persistence of visually-induced ERPs in human patients with absence epilepsy

We examined the neocortical sensory responses in 13 children with drug-resistant typical childhood absence epilepsy and 7 non-epileptic children, using multi-site EEGs (**Figure 1A**) and intermittent flash light stimulations (see **Materials and Methods**). Epileptic and control healthy children had

approximately the same age (epileptic children, 11.9 ± 1.1 years old, 6-18 years, $n = 13$; control children, 11.6 ± 1.7 years old, 6-18 years, $n = 7$). With respect to antiepileptic medications, the most common was lamotrigine, followed by levetiracetam and sodium valproate. Three epileptic children received a combination of two antiepileptic drugs and three others were off treatment because no medication was effective. A total of 153 absences were recorded, including 45 episodes during which visual stimulations were given. They could be detected from all EEG electrodes (**Figure 1A**), including the occipital derivations (**Figure 1B2**), had a duration ranging from 1 to 50 seconds, an optimal internal frequency between 3 and 3.5 Hz and displayed variable amplitude between patients.

In nearly all children and recording conditions, including quiescent periods in healthy subjects, interictal and ictal periods from epileptic subjects, light flashes evoked detectable vERPs after averaging (> 30 successive trials) of EEG waves recorded from the occipital electrodes (**Figure 1C, right**). However, in one patient, although no vERPs could be detected during interictal epochs, despite the large number of trials ($n = 61$), a clear average cortical response was evidenced during epileptic episodes. The reverse situation was never observed. The random averaging of EEG records during the three conditions did not produce any wave having the latency and the shape of those evoked by the flashes (**Figure 1C, left**). This indicates that the sensory responses recorded during absences were not significantly contaminated by the spontaneously occurring spike-and-wave complexes.

When sensory stimulations were delivered during seizures, the amplitude of occipital vERPs was mostly enhanced ($n = 10$ out of 13 epileptic children) compared to interictal periods in the same patient (ictal vERPs, $18.0 \pm 3.6 \mu\text{V}$, $n = 13$ patients; interictal vERPs, $6.2 \pm 1.5 \mu\text{V}$, $n = 13$ patients, $p = 0.02$) (**Figure 1C2,3 right & D**). We considered amplitude comparison between different children unreliable due to differences in skull and electrode impedances, which may alter the absolute amplitude of inter-individual EEG signals. During seizures, vERPs occurred more promptly, with a significant decrease in their latencies (109.6 ± 7.3 ms, $n = 13$ patients) compared to that measured from control children (147.7 ± 14.4 ms, $n = 7$ subjects, $p = 0.025$) (**Figure 1C right & E**). However, the peak latency of the sensory response during absences was slightly, but not significantly, shorter compared to the corresponding interictal periods (129.83 ± 6.99 ms, $n = 12$ patients, $p = 0.06$) (**Figure 1C right & E**). No significant difference was found between the latencies of vERPs generated during interictal epochs and baseline activity in healthy subjects ($p = 0.4$). There were no correlative relationships between vERPs amplitude and latency and the anti-absence drugs administrated.

All epileptic patients were completely unresponsive during seizures, with no post-ictal recollection of the sensory stimuli applied during absences.

Whisker-evoked ERPs are not altered during SWDs in the GAERS

Our recordings from epileptic children indicated that visual stimuli applied during seizures, although not consciously detected, could access and be processed by the cerebral cortex, as evidenced by the reproducible vERPs at occipital regions, which could be even enhanced in amplitude compared to that recorded during interictal periods. We next tested whether sensory events can be processed in the cerebral cortex of the rat genetic model during SWDs, using a sensory channel, the vibrissae system, essential for tactile perception of the environment in rodents [48]. We thus compared the whisker-evoked responses recorded in

the S1 cortex during interictal periods and SWDs in GAERS (n = 11) to those obtained from the same cortical region in control Wistar rats (n = 11).

Background EEG activity recorded under fentanyl sedation from the S1 cortex of control rats (**Figure 2A1, top record**) and GAERS between seizures (**Figure 2B1, top record**) had a low-amplitude desynchronized pattern and displayed similar frequency contents, with a preferred frequency at 2-4 Hz intermingled with faster activity up to 40 Hz (**Figure 2A1 & 2B1**). At the occurrence of seizure activity, the interictal desynchronized cortical EEG of GAERS was replaced by large-amplitude SWDs (**Figure 2C1 & 3B3, top record**), having an internal frequency of 7.9 ± 0.2 Hz, a mean duration of 5.7 ± 2.3 s and spontaneously recurring with highly variable time intervals (95 ± 67 s, n = 416 SWDs from 11 GAERS) (**Figure 2C1 & 3B3, top record**). The overall properties of SWDs recorded in this study are similar to those described previously under analogous experimental conditions [17,18,20,34] and in freely moving GAERS [13,17].

Square air-puff stimuli were repeatedly applied on whiskers of non-epileptic rats and GAERS, in between and during seizures, with the minimal intensity to produce the largest wERP in absence of cortical paroxysmal activities (10–40 p.s.i., interictal period in GAERS; 10–50 p.s.i., control Wistar rats). Using this range of intensities, whisker stimulations did not interrupt the seizures (see **Figure 4B1 right**) and the stimulus-trigger averaging (> 20 trials) of cortical EEG waves revealed a clear-cut wERP during SWDs (**Figure 2C2**). In most cases, individual sensory-evoked responses could be identified and distinguished to the spike component of the spike-and-wave complex due to their reproducible shapes and latencies (see **Figure 4B2,3, top records at right**). wERPs recorded concurrently with SWDs had similar complex waveforms than those acquired during interictal epochs and from control rats, including a consistent early negative component of large amplitude followed by 2 to 3 deflections with variable amplitude and of positive or negative polarity (**Figure 2A2, 2B2, 2C2 & 2D**) [39,50,51]. The peak latency of the early component of the wERPs, calculated after averaging of 20 to 40 successive trials, was similar in the three conditions (control Wistar rats, 22.0 ± 1.5 ms, n = 11 animals; GAERS interictal, 20.5 ± 1.5 ms; GAERS ictal, 20.4 ± 1.5 ms, n = 11 animals; p = 0.4) (**Figure 2D & 2E, left**). Moreover, we did not measure any significant modifications in the average amplitude of the early wERPs wave recorded during cortical paroxysms and interictal periods (GAERS ictal, 45.7 ± 12.7 μ V; GAERS interictal 44.0 ± 12.4 μ V, n = 11 animals; p = 0.7) (**Figure 2B2, 2C2 & 2E, right**).

Spontaneous activity and excitability of S1 cortex neurons in GAERS and control Wistar rats

The stability of latency of wERPs in non-epileptic rats compared to GAERS, and the constancy of their amplitude during SWDs compared to interictal conditions, confirm and extend our findings from human patients that absence seizures do not preclude the conveying of sensory inputs towards the cerebral and their processing by cortical networks. However, these surface field potentials do not allow determining whether the synaptic responses and output activity of individual cortical neurons are altered during seizures. Thus, we made concomitant EEG and intracellular recordings from quiescent periods in control Wistar rats and during seizures and interictal epochs in GAERS, and compared the cell responses between the three conditions.

Intracellular recordings from non-epileptic rats (n = 14 neurons from 11 rats) and GAERS (19 neurons from 10 GAERS) were performed in the facial part

of S1 cortex, previously identified as the cortical area generating SWDs in rodent genetic models [15,17,18,52]. In control rats (**Figure 3A1**) and GAERS (**Figure 3B1**), recorded cells were located at similar coordinates and within layers 5 and 6 (see **Materials and Methods**). Their current-evoked firing patterns were mostly regular spiking (7 out of 14 neurons in Wistar rats; 14 out 19 neurons in GAERS) or intrinsic bursting, indicating that neurons were of pyramidal type [53]. Pyramidal cells of non-epileptic rats displayed spontaneous depolarizing synaptic events of variable amplitude, leading to a mean membrane potential of -65.7 ± 0.6 mV ($n = 14$ neurons) (**Figure 3A2 & 3C**) and responsible, in the active cells ($n = 11$ out 14 neurons), for a moderate background firing rate (3.1 ± 0.8 Hz, $n = 11$) (**Figure 3A2 & 3C**). As previously described [17,18,34], S1 cortical neurons of GAERS displayed during interictal periods a frequency of spontaneous discharge (6.7 ± 1.1 Hz, $n = 19$ neurons) (**Figure 3B2**) significantly more elevated ($p < 0.01$) than that of homotypic non-epileptic neurons, due to a more depolarized membrane potential (-61.8 ± 0.8 mV, $n = 19$ neurons, $p < 0.001$, **Figure 3C**). The occurrence of a SWD in the EEG was accompanied in GAERS cortical neurons with suprathreshold oscillatory membrane depolarizations that were temporally correlated with the surface cortical oscillations (**Figure 3B3**). These repetitive membrane depolarizations were superimposed on a tonic hyperpolarization of 12.5 ± 1.61 mV ($n = 416$ SWDs from 19 neurons), lasting for the entire epileptic activity and reaching a mean value of -75.4 ± 2.1 mV ($n = 416$ SWDs from 19 neurons) (**Figure 3B3 & C, envelope**), which was significantly more negative compared to that measured from interictal periods and from baseline activity in non-epileptic animals ($p < 0.001$) (**Figure 3C**). The mean membrane potential during seizures (-67.9 ± 1.7 mV, $n = 416$ SWDs from 19 neurons), including oscillatory depolarizations and excluding action potentials, was similar to that of non-epileptic rats ($p = 0.1$) (**Figure 3C**).

Neurons recorded from non-epileptic rats and GAERS did show any significantly differences in other basic electrophysiological features, including action potential threshold (Control Wistar rats, -51.5 ± 0.9 mV, $n = 14$ neurons; GAERS, -51.1 ± 0.7 mV, $n = 19$ neurons; $p = 0.7$) and membrane time constant (control Wistars, 8.1 ± 0.4 ms, $n = 14$ neurons; GAERS, 8.6 ± 0.5 ms, $n = 18$ neurons; $p = 0.5$). Only the apparent membrane input resistance of GAERS neurons (28.6 ± 2.1 M Ω , $n = 18$ neurons), measured during interictal periods, was enhanced compared to that calculated in normal rats (20.6 ± 1.1 M Ω , $n = 14$ neurons; $p = 0.01$).

Intracellular responses of S1 cortex neurons to sensory inputs during quiescent periods and SWDs

To determine whether sensory integration is altered in individual cortical neurons, we next compared the intracellular responses of S1 cortex neurons of non-epileptic ($n = 14$ neurons from 11 rats) and epileptic rats ($n = 11$ neurons from 8 GAERS) to air-puff stimuli applied to the contralateral whiskers (**Figure 41 & B1**). In each experiment, the pressure intensity was preliminarily adjusted, in absence of cortical paroxysms, to produce an optimal wERP (see **Materials and Methods**).

In non-epileptic rats, low-frequency (0.24 Hz) mechanical stimulations of whiskers generated in S1 cortex neurons sub- or suprathreshold depolarizing postsynaptic potentials (dPSPs) having a mean latency, relative to the onset of the stimulus, of 17.6 ± 0.5 ms ($n = 349$ responses from 14 neurons) (**Figure 4A & 5A**). In 9 out 14 tested cells ($\sim 64\%$), sensory-evoked responses could evoke

an action potential with a mean probability of 0.42 ± 0.1 ($n = 9$) (**Figure 4A2 & 5C**) and an average latency of 23.6 ± 1.9 ms (**Figure 4A2 & 5D**). The subthreshold responses had a mean amplitude of 6.8 ± 0.6 mV ($n = 14$ neurons) (**Figure 4A3 & 5B**).

The intracellular responses recorded from GAERS cortical neurons during interictal periods (**Figure 4B1, left**) were globally similar to that of neurons recorded from non-epileptic rats. First, the latency of sensory-evoked responses, including sub- and suprathreshold events, was 17.6 ± 0.6 ms ($n = 180$ responses from 11 neurons, $p > 0.9$). Second, the proportion of epileptic neurons that could respond by suprathreshold dPSPs was roughly the same (54%, 6 out of 11 neurons) and the probability with which individual dPSPs could generate an action potential (0.43 ± 0.1 , $n = 6$ neurons) was identical ($p = 0.8$) to that calculated from non-epileptic animals. Moreover, the corresponding latency of discharge (28.0 ± 3.7 ms, $n = 6$ neurons) was also found similar compared to control neurons ($p = 0.2$). Finally, the amplitude of subthreshold dPSPs (5.2 ± 0.6 mV, $n = 11$ neurons) (**Figure 4B3 & 5C**) was slightly, but not significantly ($p = 0.08$), reduced compared to responses recorded from non-epileptic animals.

One of the major outcomes of the present study was the description of the cortical intracellular responses to sensory stimuli during absence seizures. GAERS neurons could respond during seizures (**Figure 4B1, right**) by sub- or suprathreshold dPSPs, with a mean latency (17.5 ± 0.6 ms; $n = 351$ responses from 10 neurons, $n = 8$ GAERS) (**Figure 4B2, right**) consistent with that calculated from control neurons ($p > 0.9$) and from the same neurons during the corresponding interictal states (**Figure 5A**, $p = 0.9$). Moreover, the occurrence of epileptic seizures did not reduce the number of neurons that could be fired by the whisker stimulations (9 out of 10 neurons, 90%), with a probability to generate an action potential in individual neurons (0.37 ± 0.1 , $n = 9$ neurons) matching that measured in the two other conditions ($p > 0.4$) (**Figure 4B2 right & 5C**). The latency of sensory-evoked action potentials during SWDs (25.7 ± 2.0 ms, $n = 9$ neurons) remained also unmodified compared to control and interictal responses ($p > 0.4$) (**Figure 4B2-3 & 5D**). The membrane potential at the occurrence of sensory-induced synaptic responses during seizures was more polarized (-70.6 ± 2.2 mV, $n = 351$ responses from 10 neurons) compared to interictal conditions ($p < 0.05$), with a value matching the mean membrane potential previously calculated during seizures ($p = 0.3$) (**Figure 3C, SWD**). The sensory-induced dPSPs that remained subthreshold for action potential discharge during seizures had a mean amplitude (9.4 ± 1.7 mV, $n = 10$ neurons) significantly larger ($p = 0.01$) than that measured in between SWDs but close to that measured from non-epileptic rats ($p = 0.1$).

Discussion

In the present study, we examined how sensory inputs, generated by natural sensory stimuli, are processed by the cerebral cortex during absence seizures. In both epileptic patients and GAERS, a well-established genetic model, cortical ERPs were still present when the stimuli were delivered during SWDs, without significant modification in shape compared to responses obtained during interictal periods and from non-epileptic subjects. Visually-evoked occipital ERPs in epileptic patients were even increased in amplitude and reduced in latency during cortical paroxysms. Using *in vivo* intracellular recordings of S1 cortex pyramidal neurons from GAERS and control rats, we found that whisker-evoked synaptic responses was increased in amplitude during the epileptic episode,

without significant change in their latency and their capacity to fire action potentials. Contrasting with earlier works suggesting a complete or partial obliteration of information transfer during absences [25,29,31], our findings demonstrate that external inputs can still access the cerebral cortex and be processed by local networks and neurons.

Sensory integration in the thalamocortical pathway during SWDs

In both human patient and epileptic rodent, surface ERPs were preserved when sensory stimuli were delivered during SWDs. Conversely, EEG epileptic discharges were not disrupted by the occurrence of cortical sensory responses, at least with the range of stimulus intensity used in the present study. These data indicate that the cellular and network mechanisms eliciting and/or sustaining spike-and-wave activities and sensory-evoked cortical potentials are not mutually exclusive. This is consistent with recent findings demonstrating that SWDs in the GAERS are initiated from synaptic interactions between ictogenic pyramidal neurons located in layer 5-6 of the somatosensory cortex [17,18,20], whereas ascending sensory inputs resulting from mechanical stimulation of the whiskers travel to the brainstem, project onto excitatory thalamocortical neurons, which in turn predominantly connect layer 4 stellate cells of the S1 cortex [48,54]. However, ictogenic and sensory cortical networks are partially interconnected and it is likely that more intense or painful stimuli will induce widespread cortical desynchronization [27,55] including the cortical region initiating seizures, and, consequently, will lead to the interruption of paroxysmal oscillations and the recovery of conscious processes [22,27].

It is very unlikely that fentanyl sedation used in GAERS experiments may have interfered with the whisker-induced sensory responses. Indeed, the spontaneous activity and receptive field size of neurons in the ventro-posterior medial (VPM) thalamic nucleus, which transmit whisker-dependent sensory inputs to the S1 cortex, are similar under fentanyl and in awaked animals [44]. Moreover, sensory-evoked responses in the layer 4 neurons of S1 cortex do not significantly differ between sedation and wakefulness [56].

The persistence of cortical responses when external stimuli are presented during SWDs challenges the assumption that sensory information is transmitted from the thalamus to the cortex only during the thalamic tonic firing mode, and that no information is transmitted during the oscillatory mode [21,25,57-59]. In contrast, our findings suggest that oscillatory behavior of thalamic neurons during absence seizures could be ideally tuned to detect fast changes in incoming sensory signals and to pass this information toward the cortex. During SWDs, sensory thalamocortical neurons exhibit membrane potential oscillations caused by regenerative low-threshold Ca²⁺ spikes, which are promoted by a prolonged membrane hyperpolarization (to around -70 mV) [18,21,60] due to a powerful GABAergic inhibition arising from the bursting of nucleus reticularis thalami (nRT) neurons [21,61,62]. At the hyperpolarizing phase of the cycle, the polarization of thalamic cells is sufficient to de-inactivate the T-type Ca²⁺ channels which are then ready to be activated by a sufficient depolarization, such as one generated by a sensory-evoked excitatory synaptic potential [63], leading to a Ca²⁺ spike and a burst of sodium action potentials that propagate to the cerebral cortex. A similar process is presumed to facilitate the detection of novel tactile stimuli during the 7-12 Hz rhythm in the somatosensory thalamocortical pathway of Long-Evans rats [54,64], which is supposed to be a functional analog of the physiological human μ rhythm [64] or an absence-like activity [65,66].

The sensory-induced synchronization of thalamocortical ascending activity could produce fast and coherent depolarizing synaptic depolarizations in cortical neurons, responsible for the early component of surface ERPs. The increased amplitude of subthreshold dPSPs in S1cortex neurons of GAERS during SWDs could result from two synergistic phenomena. First, the sustained membrane hyperpolarization of cortical cells accompanying seizures could increase the driving force of excitatory synaptic currents and, thus, the amplitude of dPSPs compared to the depolarized interictal state. Second, the steady polarization of cortical neurons resulting from a synaptic disfacilitation, *i.e.* temporal absence of tonic network activity, could lead to an increase in membrane input resistance responsible for an amplification of synaptic potentials [21,67]. Assuming the existence of a similar cellular process in human cortical cells, the enlargement of sensory-induced dPSPs in many occipital neurons during seizures may account for the increased amplitude of vERPs. The mechanisms by which vERPs are more prompted when the stimulus is presented during SWDs remain unclear. However, it is plausible that the burst-responses caused by sharp Ca²⁺ spikes will be rapidly and tightly synchronized among thalamocortical cells integrating the same sensory inputs [54] reducing thereby the latency of the sensory cortical responses compared to the more graded responses generated during desynchronized activity in the primary visual cortex [68].

Sensory responses in the cortex without conscious experience

We demonstrated that specific sensory stimuli are able to produce accurate and reliable neuronal responses in the related cortical areas during SWDs, whereas the subjects remain unresponsive. Our findings thus dispute the well-admitted assumption that synchronized oscillations in thalamocortical loops disrupt conscious perception by filtering-out external sensory inputs and/or disallowing their allocation to the appropriate cortical assemblies [21,57,58,69,25,59,70]. Nonetheless, they are in fact in agreement with a number of studies, ranging from single unit recordings in animals [71] to human EEG [72] and neuroimaging [73] experiments, which demonstrate the persistence of brain responses to sensory stimulations during non-rapid eye movement sleep, suggesting that the brain can still process external stimuli during thalamocortical oscillations that make however the subject unresponsive. Moreover, even in patients with cortical blindness, unaware of the visual stimulus, vERPs can be recorded [74]. More recent studies combining EEG and fMRI in human indicate that auditory cortical responses persist during non-rapid eye movement sleep, except during spindles [75,76] and the negative going phase of the slow-wave oscillations during which responses become less consistent or even absent [76]. This suggests that processing of sensory inputs during thalamocortical rhythms is strongly influenced by the phase of the oscillation at which stimuli are delivered [77].

During absence seizures, the functional dissociation between the electrophysiological responses in primary sensory cortices and the lack of conscious perception remains enigmatic. However, since the internal frequency of seizures is of ~ 2 -4 Hz in human and ~ 7 Hz in the GAERS, any cortical response to external stimuli will be necessarily concomitant with or shortly followed (within a time window < 500 ms in human) by the appearance of a spike-and-wave complex. The occurrence of such a cortical paroxysmal event will thus interfere with the post-stimulus neuronal activity (lasting ~ 500 ms) required to allow the initial cortical sensory response to elicit a conscious experience [78]. Supporting this hypothesis, it has been shown that a direct electrical stimulation of the human primary somatosensory cortex precludes the

conscious perception of an external event when the cortical stimulation is applied shortly after (< 500 ms) the sensory stimulus [79].

Alternatively, it has been recently proposed that the loss of consciousness during absence seizures is caused by a disruption of the normal information processing in large-scale brain networks. Recent investigations in patients with generalized SWDs, associating EEG and fMRI analyses, indicated bilateral thalamic activation with variable fMRI cortical signals, decreasing [80] or increasing [81] in lateral frontal and parietal association areas. Combining these data with consistent results obtained in animal models [1,4,32] leads to the assumption that a transient functional disorder in bilateral association cortex and related subcortical structures is primarily responsible for the impairment of consciousness and the inability to generate a full-blown conscious sensation during absence seizures.

Acknowledgments: We thank W Szurhaj and MD Lamblin for help in EEG recordings and M Pidoux for help in data analysis.

Funding: This work was supported by the Ligue Française Contre l'Épilepsie (LFCE), la Fédération Française pour la Recherche contre l'Épilepsie (FFRE), Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC) and the Fondation de France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SC SM MC. Performed the experiments: MC SC LV AK. Analyzed the data: SM MC LV. Wrote the paper: SC SM MC.

References

- 1 Cavanna AE, Monaco F. (2009) Brain mechanisms of altered conscious states during epileptic seizures. *Nat Rev Neurol* 5: 267-276 .
- 2 Panayiotopoulos CP, Koutroumanidis M, Giannakodimos S, Agathonikou A. (1997) Idiopathic generalised epilepsy in adults manifested by phantom absences, generalised tonic-clonic seizures, and frequent absence status. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63: 622-627.
- 3 Panayiotopoulos CP. (2008) Typical absence seizures and related epileptic syndromes: assessment of current state and directions for future research. *Epilepsia* 49: 2131-2139.
- 4 Blumenfeld H. (2005) Consciousness and epilepsy: why are patients with absence seizures absent? *Prog Brain Res* 150: 271-286.
- 5 Gibbs F, Davis H, Lennox WG. (1935) The electroencephalogram in epilepsy and in conditions of impaired consciousness. *Arch Neurol Psychiatr* 34: 1133-1148.
- 6 Williams D. (1953) A study of thalamic and cortical rhythms in petit mal. *Brain* 76: 50-69.
- 7 Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH et al. (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51: 676-685.
- 8 Lemieux J, Blume WT. (1986) Topographical evolution of spike-wave complexes. *Brain Res* 373: 275-287.
- 9 Blume W, Lemieux JF. (1988) Morphology of spikes in spike-and-wave complexes. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 69: 508-515.
- 10 Holmes MD, Brown M , Tucker DM. (2004) Are "generalized" seizures truly generalized? Evidence of localized mesial frontal and frontopolar discharges in absence. *Epilepsia* 45: 1568-1579.
- 11 Sadleir LG, Farrell K, Smith S, Connolly MB, Scheffer IE. (2006) Electroclinical features of absence seizures in childhood absence epilepsy. *Neurology* 67: 413-418.
- 12 Westmijse I, Ossenblok P, Gunning B, van Luijtelaar G. (2009) Onset and propagation of spike and slow wave discharges in human absence epilepsy: A MEG study. *Epilepsia* 50: 2538-2548 .
- 13 Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C. (1998) Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol* 55: 27-57.

- 14 Depaulis A, van Luijtelaar G. (2006) Genetics models of Absence Epilepsy in the rat. In Schwartzkroin PA Pitkanen A, Moshé SL editors. *Models of Seizures and Epilepsy*. London: Elsevier Academic Press. pp. 233-248.
- 15 Meeren H K, Pijn JP, Van Luijtelaar EL, Coenen, AM, Lopes da Silva FH. (2002) Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* 22: 1480-1495.
- 16 Meeren H, van Luijtelaar G, Lopes da Silva F, Coenen A. (2005) Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol* 62: 371-376 .
- 17 Polack PO, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A et al. (2007) Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci* 27: 6590-6599 .
- 18 Polack PO, Mahon S, Chavez M, Charpier S. (2009) Inactivation of the somatosensory cortex prevents paroxysmal oscillations in cortical and related thalamic neurons in a genetic model of absence epilepsy. *Cereb Cortex* 19: 2078-2091.
- 19 Guillemain D, SAILLET S, REYT S, DERANSART C, SEGEBARTH C et al. (2008) Identifying neural drivers with functional MRI: an electrophysiological validation. *PLoS Biol* 6: 2683-2697.
- 20 Chipaux M, Charpier S, Polack PO. (2011) Chloride-mediated inhibition of the ictogenic neurones initiating genetically-determined absence seizures. *Neuroscience* 192: 642-651 .
- 21 Timofeev I, Steriade M. (2004) Neocortical seizures: initiation, development and cessation. *Neuroscience* 123: 299-336.
- 22 Paz J, Polack PO, Slaght SJ, Deniau JM, Chavez M et al. (2009) Cortical initiation of absence seizures, propagation to basal ganglia and back to the cortex. In: Tang FR, editor. *Pan-brain abnormal neural network in epilepsy*. Kerala: Research Signpost. pp. 41-65.
- 23 Schwab R. (1939) A method of measuring consciousness in petit mal epilepsy. *J. Nerv. Ment. Dis* 89: 690-691.
- 24 Mirsky AF, Vanburen JM. (1965) On the nature of the "absence" in centrencephalic epilepsy: a study of some behavioral electroencephalographic and autonomic factors. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 18: 334-348.
- 25 Kostopoulos GK. (2001) Involvement of the thalamocortical system in epileptic loss of consciousness. *Epilepsia* 42: Suppl 3: 13-19.
- 26 Blumenfeld H, Taylor J. (2003) Why do seizures cause loss of consciousness? *Neuroscientist* 9: 301-310.

- 27 Jung R. (1939) Uber vegetative Reaktionen und Hemmungswirkung von Sinnesreizen im kleinen epileptischen Anfall. *Nervenarzt*. 12: 169-185.
- 28 Fedio P, Mirsky AF. (1969) Selective intellectual deficits in children with temporal lobe or centrencephalic epilepsy. *Neuropsychologia* 7: 287-300.
- 29 Duncan CC, Mirsky AF, Lovelace CT, Theodore WH. (2009) Assessment of the attention impairment in absence epilepsy: comparison of visual and auditory P300. *Int J Psychophysiol* 73: 118-122.
- 30 Duncan C. (1988) Application of event-related brain potentials to the analysis of interictal attention in absence epilepsy. In MS Myslobodsky, Mirsky AF editors. *Elements of Petit Mal Epilepsy*. New York: Peter Lang. pp 341-364.
- 31 Orren MM. (1978) Evoked potential studies in petit mal epilepsy. Visual information processing in relation to spike and wave discharges. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*: 251-257.
- 32 Blumenfeld H, Westerveld M, Ostroff RB, Vanderhill SD, Freeman J. et al. (2003) Selective frontal, parietal, and temporal networks in generalized seizures. *Neuroimage* 19: 1556-1566.
- 33 van Luijtelaar G, Sitnikova E. (2006) Global and focal aspects of absence epilepsy: the contribution of genetic models. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 983-1003.
- 34 Polack PO, Charpier S. (2009) Ethosuximide converts ictogenic neurons initiating absence seizures into normal neurons in a genetic model. *Epilepsia* 50: 1816-1820.
- 35 Vergnes M, Marescaux C, Boehrer A, Depaulis A. (1991) Are rats with genetic absence epilepsy behaviorally impaired? *Epilepsy Res* 9: 97-104.
- 36 Getova D, Bowery NG, Spassov V. (1997) Effects of GABAB receptor antagonists on learning and memory retention in a rat model of absence epilepsy. *Eur J Pharmacol* 320: 9-13.
- 37 Pastor MA, Valencia M, Artieda J, Alegre M, Masdeu JC. (2007) Topography of cortical activation differs for fundamental and harmonic frequencies of the steady-state visual-evoked responses. An EEG and PET H215O study. *Cereb Cortex* 17: 1899-1905.
- 38 Vialatte FB, Maurice M, Dauwels J, Cichocki A. (2010) Steady-state visually evoked potentials: focus on essential paradigms and future perspectives. *Prog Neurobiol* 90: 418-438.
- 39 Pidoux M, Mahon S, Deniau JM, Charpier S. (2011) Integration and propagation of somatosensory responses in the corticostriatal pathway: an intracellular study in vivo. *J Physiol* 589: 263-281.

- 40 Commission on classification and terminology of the ILAE. (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 30: 389-399.
- 41 Hirsch E, Panayiotopoulos CP. (2005) Epilepsie-absences de l'enfance et syndromes apparentés. In Bureau M, Roger J, Dravet C, Genton P, Tassinari CA, Wolf P editors. *Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent*. London: John Libbey. pp. 315-336.
- 42 Jasper H. (1958) Report of the committee on methods of clinical examination in electroencephalography. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 10: 370-375.
- 43 Rees G, Kreiman G, Koch C. (2002) Neural correlates of consciousness in humans. *Nat Rev Neurosci* 3: 261-270.
- 44 Bruno RM, Sakmann B. (2006) Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science* 312: 1622-1627.
- 45 Paxinos G, Watson C. (1986) *The brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press. 456 p.
- 46 Chung S, Li X, Nelson SB. (2002) Short-term depression at thalamocortical synapses contributes to rapid adaptation of cortical sensory responses in vivo. *Neuron* 34: 437-446.
- 47 Carvell GE, Simons DJ. (1990) Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci* 10: 2638-2648.
- 48 Fox K. (2008) *Barrel cortex*. Cambridge: Cambridge University Press. 298 p.
- 49 Mahon S, Deniau JM, Charpier S. (2003) Various synaptic activities and firing patterns in cortico-striatal and striatal neurons in vivo. *J Physiol Paris* 97: 557-566.
- 50 Mahon S, Charpier S. (2012) Bidirectional plasticity of intrinsic excitability controls sensory inputs efficiency in layer 5 barrel cortex neurons in vivo. *J Neurosci* 32: 11377-11389.
- 51 Syed E, Sharott A, Moll CK, Engel AK, Kral A. (2011) Effect of sensory stimulation in rat barrel cortex, dorsolateral striatum and on corticostriatal functional connectivity. *Eur J Neurosci* 33: 461-470.
- 52 Manning JP, Richards DA, Leresche N, Crunelli V, Bowery NG. (2004) Cortical-area specific block of genetically determined absence seizures by ethosuximide. *Neuroscience* 123: 5-9.
- 53 Gutnick M, Crill WE. (1995) The cortical neuron as an electrophysiological unit. In Gutnick MJ, Mody I editors. *The Cortical Neuron*. Oxford: Oxford University Press. pp. 33-52.

- 54 Nicolelis MA, Fanselow EE. (2002) Thalamocortical optimization of tactile processing according to behavioral state. *Nat Neurosci* 5: 517-523.
- 55 Conte B, Cutrufo C, Manzini S. (1996) Electrocorticographic desynchronization after application of visceral and somatic noxious stimuli in urethane-anesthetized rats: effect of intrathecal administration of tachykinin (NK 1 or NK 2) receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 212-218.
- 56 Simons D, Carvell GE, Hershey AE, Bryant DP. (1992) Responses of barrel cortex neurons in awake rats and effects of urethane anesthesia. *Exp Brain Res* 91: 259-272.
- 57 Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ. (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262: 679-685.
- 58 Steriade M. (2000) Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience* 101: 243-276.
- 59 Llinas RR, Steriade M. (2006) Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J Neurophysiol* 95: 3297-3308.
- 60 Pinault D, Leresche N, Charpier S, Deniau JM, Marescaux C et al. (1998) Intracellular recordings in thalamic neurones during spontaneous spike and wave discharges in rats with absence epilepsy. *J Physiol* 509: 449-456.
- 61 Slaght SJ, Paz T, Mahon S, Maurice N, Charpier S et al. (2002) Functional organization of the circuits connecting the cerebral cortex and the basal ganglia: implications for the role of the basal ganglia in epilepsy. *Epileptic Disord* 4: Suppl 3: S9-22.
- 62 Pinault D. (2003) Cellular interactions in the rat somatosensory thalamocortical system during normal and epileptic 5-9 Hz oscillations. *J Physiol* 552: 881-905.
- 63 Brecht M, Sakmann B. (2002) Whisker maps of neuronal subclasses of the rat ventral posterior medial thalamus, identified by whole-cell voltage recording and morphological reconstruction. *J Physiol* 538: 495-515.
- 64 Wiest M, Nicolelis MA. (2003) Behavioral detection of tactile stimuli during 7-12 Hz cortical oscillations in awake rats. *Nat Neurosci* 6: 913-914.
- 65 Shaw F. (2004) Is spontaneous high-voltage rhythmic spike discharge in Long Evans rats an absence-like seizure activity?. *J Neurophysiol* 9: 63-77.
- 66 Polack PO, Charpier S. (2006) Intracellular activity of cortical and thalamic neurones during high-voltage rhythmic spike discharge in Long-Evans rats in vivo. *J Physiol* 571: 461-476.
- 67 Charpier S, Leresche N, Deniau JM, Mahon S, Hughes SW, et al. (1999) On the putative contribution of GABA(B) receptors to the electrical events

occurring during spontaneous spike and wave discharges. *Neuropharmacology* 38: 1699-1706.

- 68 Azouz R, Gray CM. (1999) Cellular mechanisms contributing to response variability of cortical neurons in vivo. *J Neurosci* 19: 2209-2223.
- 69 Steriade M, Dossi RC, Nuñez A. (1991) Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression. *J Neurosci* 11: 3200-3217.
- 70 Young G, Pigott SE. (1999) Neurobiological basis of consciousness. *Arch Neurol* 56: 153-157.
- 71 Edeline J. (2003) The thalamo-cortical auditory receptive fields: Regulation by the states of vigilance, learning and the neuromodulatory systems. *Exp Brain Res* 153: 554-572.
- 72 Bastuji H, García-Larrea L. (1999) Evoked potentials as a tool for the investigation of human sleep. *Sleep Med Rev* 3: 23-45.
- 73 Portas C, Krakow K, Allen P, Josephs O, Armony JL et al. (2000) Auditory processing across the sleep-wake cycle: Simultaneous EEG and fMRI monitoring in humans. *Neuron* 28: 991-999.
- 74 Wygnanski-Jaffe T, Panton CM, Buncic JR, Westall CA. (2009) Paradoxical robust visual evoked potentials in young patients with cortical blindness. *Doc Ophthalmol* 119: 101-107.
- 75 Dang-Vu TT, Bonjean M, Schabus M, Boly M, Darsaud A et al. (2011) Interplay between spontaneous and induced brain activity during human non-rapid eye movement sleep. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 15438-15443.
- 76 Schabus M, Dang-Vu TT, Heib DP, Boly M, Deseilles M et al. (2012) The Fate of Incoming Stimuli during NREM Sleep is Determined by Spindles and the Phase of the Slow Oscillation. *Front Neurol* 3: 40.
- 77 Massimini M, Rosanova M, Mariotti M. (2003) EEG slow (approximately 1Hz) waves are associated with non stationarity of thalamocortical sensory processing in the sleeping human. *J Neurophysiol* 89: 1205-1213.
- 78 Libet B, Alberts WW, Wright EW Jr, Feinstein B. (1967) Responses of human somatosensory cortex to stimuli below threshold for conscious sensation. *Science* 158: 1597-1600.
- 79 Libet B, Alberts WW, Wright Jr EW, Feinstein B. (1972) Cortical and thalamic activation in conscious sensory experience. In: Somjen GG editor. *Neurophysiology studied in man*. Amsterdam: Excerpta Medica. pp.157-168.

- 80 Hamandi K, Salek-Haddadi A, Laufs H, Liston A, Friston K et al. (2006) EEG-fMRI of idiopathic and secondarily generalized epilepsies. *Neuroimage* 31: 1700-1710.
- 81 Blumenfeld H, Varghese GI, Purcaro MJ, Motelow JE, Enev M et al. (2009) Cortical and subcortical networks in human secondarily generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 132: 999-1012.

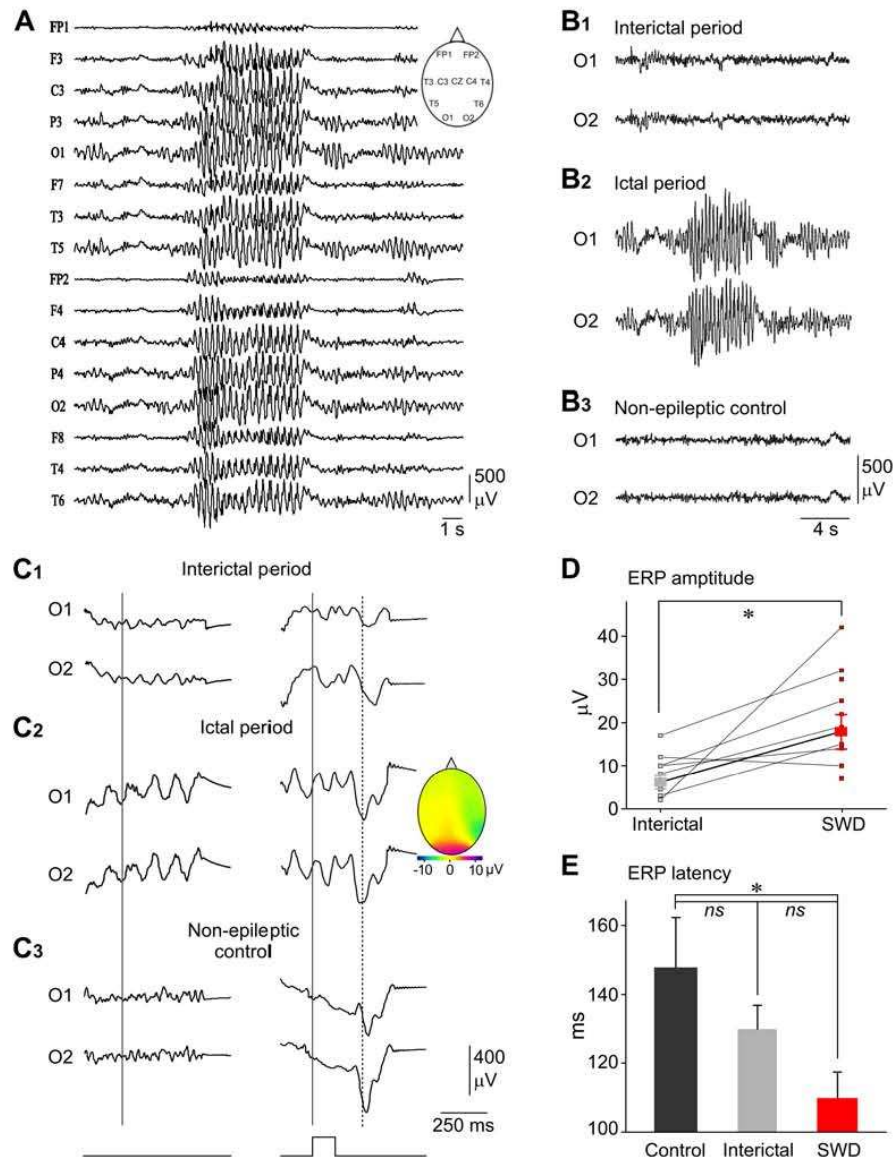


Figure 1. Visually-evoked ERPs are still present during SWDs in patients with absence epilepsy. (A) Bilateral spike-and-wave activity recorded from surface EEG electrodes in a 12 years-old patient with typical childhood absence epilepsy. The conventional locations of electrodes are indicated in the *inset*. (B) Typical examples of bilateral occipital EEG recordings obtained from a 12 years-old epileptic girl, between (B1) and during (B2) seizures, and from a non-epileptic subject (B3). Averaging ($n > 90$) of bilateral occipital EEG signals, during interictal (C1) and ictal (C2) periods (same patient as in B), and during a baseline period from a control patient (C3). The averaging was triggered (vertical gray line) randomly (left column) or by the light flashes (bottom traces) (right column). The dashed vertical line indicates the peak latency of the averaged visually-evoked ERPs obtained during seizures. The colour-coded topography of the ERPs amplitude (*Inset*) shows the occipital dominance of the responses. (D) Population data showing the change in ERPs amplitude evoked during interictal periods and SWDs. The lines connect the values obtained from individual patients ($n = 12$). In

one patient, sensory responses were detectable only during seizures (data not depicted in the graph). The thick line indicates the mean values (\pm SEM) calculated from the overall population. (E) Pool data showing that the latency of sensory cortical responses was significantly reduced during SWDs ($n = 13$ patients) compared to that measured from control subjects ($n = 7$). Bar graphs represent the mean \pm SEM (see results for detailed quantifications and statistical comparisons). * $p < 0.05$; ns, nonsignificant.

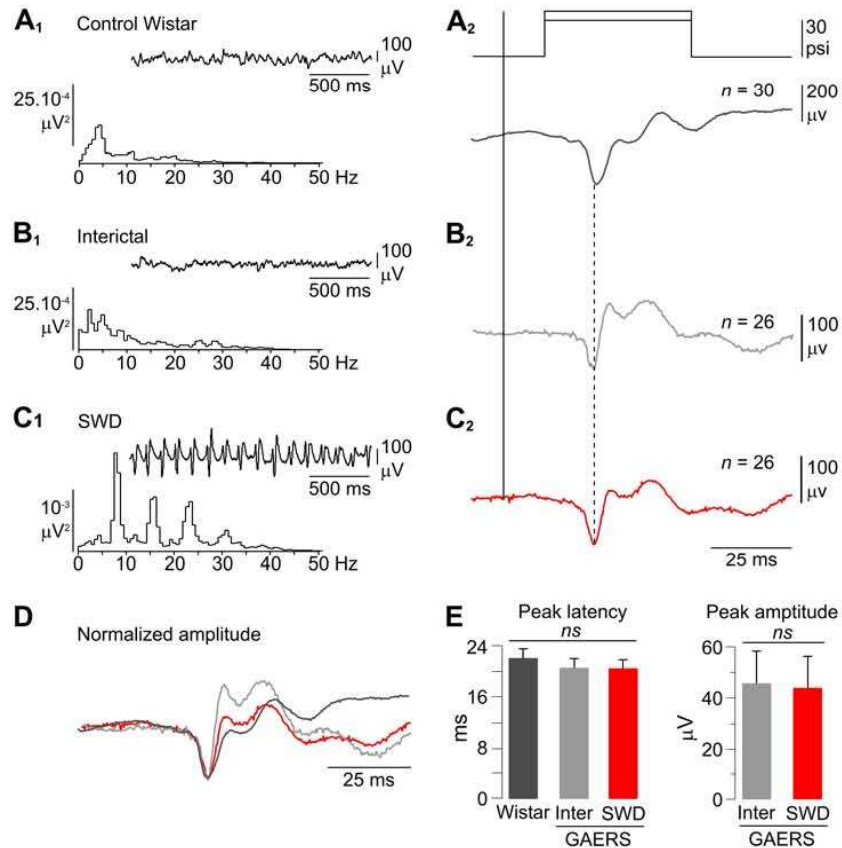


Figure 2. wERPs are not significantly altered during SWDs in the GAERS. (A1-C1) Frequency power spectra computed from 5 s of spontaneous EEG activity, including the truncated records shown in the corresponding *insets*, from a non-epileptic rat (A1) and during interictal (B1) and ictal (C1) periods in a GAERS. (A2-C2) Average (the number of trials is indicated) wERPs obtained in the three conditions as shown in A1-C1, in response to air-puff stimuli applied to the contralateral whiskers (top traces). The latency of wERPs was measured as the time difference between the onset of the air-puff (solid line) and the peak of the first negativity of evoked potentials (dashed line). (D) Superimposition of the average records shown in A2-C2, with normalized amplitude (using the initial negative component as the amplitude reference) and using the onset of the sensory stimulus as the time reference. Note the constancy in latency and shape of the first component of the wERPs in the non-epileptic Wistar rat and the GAERS. (E) Pooled data showing that the peak latency of the early sensory responses was not significantly different in the three conditions (Control Wistar rats, $n = 11$; Interictal periods (Inter) and SWDs in GAERS, $n = 11$; $p = 0.4$) (left), with an amplitude during SWDs that remained unchanged compared to the corresponding interictal periods ($n = 11$ GAERS; $p = 0.7$) (right). Bar graphs represent the mean \pm SEM (see results for detailed quantifications).

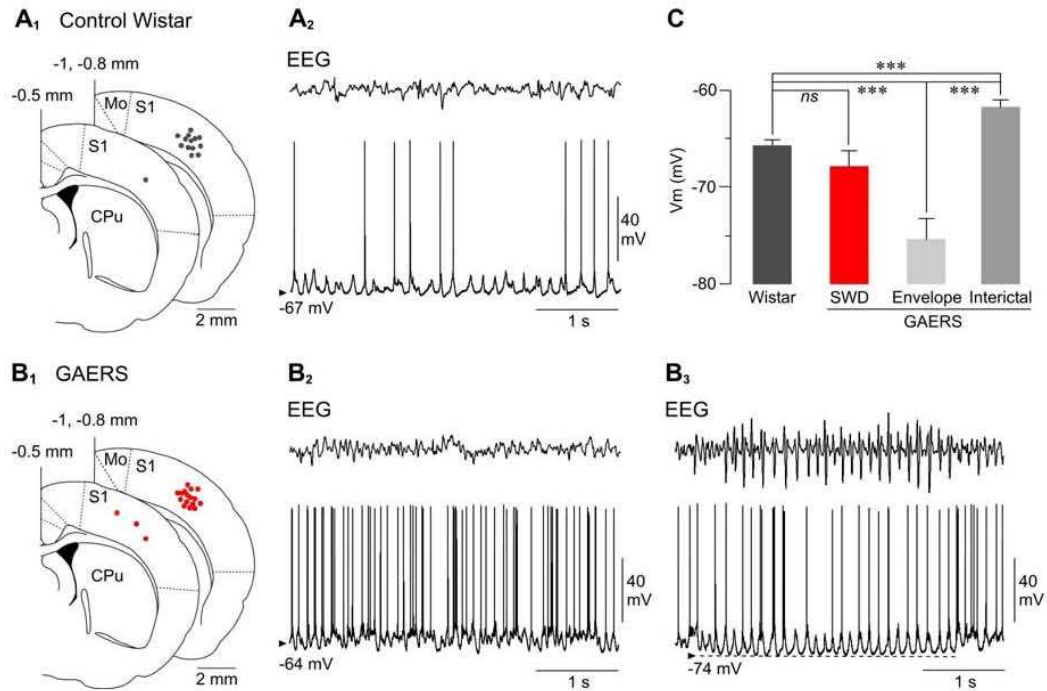


Figure 3. Spontaneous intracellular activities of S1 cortex neurons from non-epileptic rats and GAERS. (A1-B1) Superimposed slice drawings, made from the stereotaxic rat brain atlas from Paxinos and Watson (1986) at the indicated distances (in millimetres) from the bregma. Black and red dots indicate the location of intracellularly recorded neurons from the S1 cortex of control Wistar rats (A1) and GAERS (B1), respectively. Mo, motor cortex; CPu, caudate-putamen. (A2, B2, B3) Simultaneous recordings of spontaneous intracellular activities (bottom records) and corresponding EEG waves (top records) from a non-epileptic rat (A2) and from a GAERS, during interictal (B2) and ictal (B3) periods. Note that the interictal irregular membrane potential fluctuations and firing pattern was replaced, at the occurrence of a SWD, by rhythmic suprathreshold membrane depolarizations superimposed on a tonic hyperpolarization that lasted for the entire epileptic episode. The arrowheads indicate membrane potential values. Records shown in B2 and B3 are from the same neuron. (C) Pooled values of mean membrane potential (V_m) from pyramidal neurons recorded in normal rats (Wistar, $n = 14$ neurons) and in GAERS ($n = 19$ neurons) during SWDs, at the sustained hyperpolarization associated with seizures (Envelope) and during interictal periods (Interictal). *** $p < 0.001$; ns, nonsignificant.

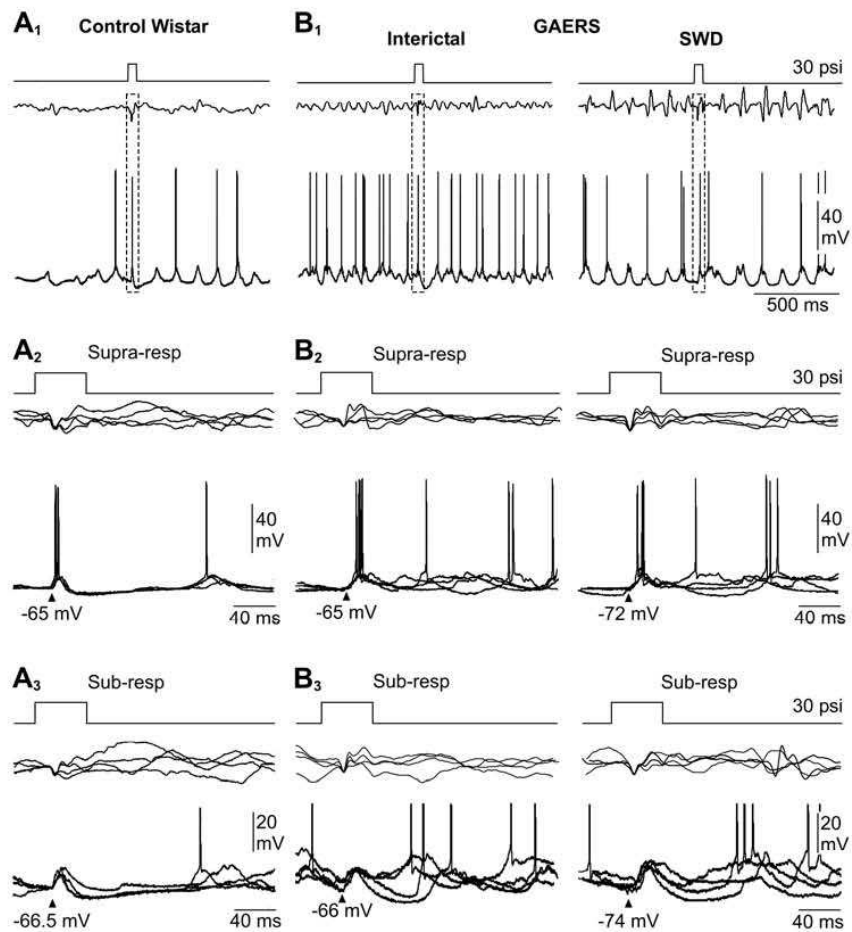


Figure 4. Sensory responses intracellularly recorded in S1 cortex neurons from non-epileptic Wistar rats and GAERS. Each panel depicts the sensory stimulus (top traces) and the corresponding responses in the EEG (middle records) and in a pyramidal neuron (bottom records) simultaneously recorded. (A1, B1) Typical examples of single sensory-evoked responses recorded from a control Wistar rat (A1) and in a GAERS (B1), during an interictal epoch (left) and during a seizure (right). The dashed boxes enclose the responses induced by whiskers deflection. (A2, B2) Superimposition ($n = 4$) of wERPs and corresponding suprathreshold intracellular responses (Supra-resp) in control (A2) and epileptic (B2) animals, during interictal (B2, left) and seizure (B2, right) periods. (A3, B3) Same representation as in A2 and B2 for neuronal responses that remained subthreshold in the three conditions. In A2, A3, B2, B3, the mean value of membrane potential at the onset of the cellular responses is indicated by the arrowheads. In A3 and B3, action potentials are truncated for clarity. Results depicted in A and B are from single neurons.

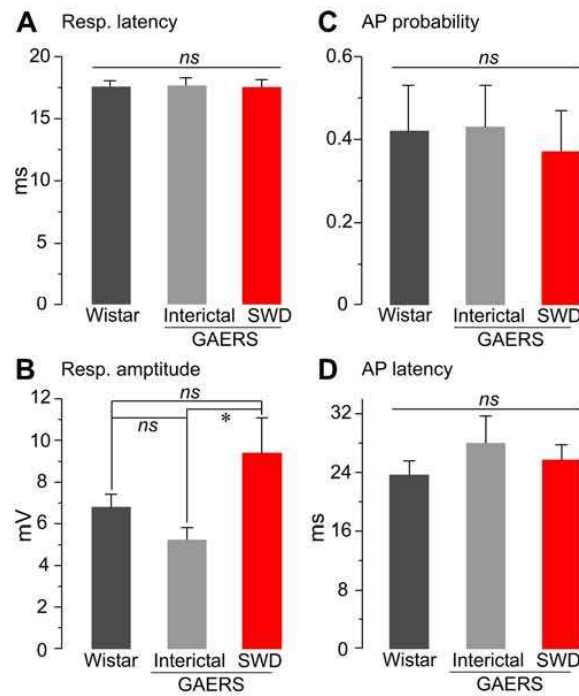


Figure 5. Properties of sensory-evoked intracellular responses from non-epileptic rats and GAERS. Pooled data of the mean latency of sensory-evoked responses (A, Resp. latency), mean amplitude of subthreshold dPSPs (B, Resp. amplitude), action potential firing probability (C, AP probability) and corresponding latency (D, AP latency) from non-epileptic Wistar rats (Wistar) and GAERS, during interictal and seizure (SWD) periods. Only the amplitude of subthreshold dPSPs during SWDs was found significantly different compared to that measured during interictal activity. * $p < 0.05$; ns, nonsignificant. Bar graphs represent the mean \pm SEM (see results for detailed quantifications).

Chapitre 3-2:

Inhibition chlore-dépendante des neurones pyramidaux corticaux initiant les crises d'absence chez le GAERS

Article 2: Chloride-mediated inhibition of the ictogenic neurones initiating genetically-determined absence seizures.

Chipaux M, Charpier S, Polack PO. Neuroscience. 192:642-51 (2011)

Rappels sur le contexte de la recherche

Dans les modèles génétiques d'épilepsie-absence (GAERS et rats WAG-Rij), un foyer ictogénique à l'origine des DPO cortico-thalamiques a été identifié dans le cortex somatosensoriel de la face (Meeren et al 2002; Polack et al 2007; Polack et al 2009). Des enregistrements intracellulaires réalisés chez le GAERS ont montré que les neurones ictogéniques étaient des cellules pyramidales localisées dans les couches profondes de ce cortex. La décharge de ces neurones lors des crises précède systématiquement celle des neurones des couches superficielles de la même région, celle des neurones corticaux des autres aires corticales et celle des neurones thalamo-corticaux correspondants (Polack et al 2007; Polack et al 2009). Ces neurones aux propriétés pro-épileptiques montrent une dépolarisation anormale de leur potentiel de membrane en période interictale, et une fréquence de décharge spontanée élevée. Au cours des crises, ils présentent des dépolarisations rythmiques entraînant des décharges de potentiels d'action brèves et répétées, en phase avec les pointes de l'EEG. Les dépolarisations rythmiques surviennent sur une hyperpolarisation soutenue qui se maintient pendant toute la durée de la crise (Polack & Charpier 2009; Polack et al 2007; Polack et al 2009).

Les mécanismes synaptiques, excitateurs et inhibiteurs, et membranaires neuronaux sous-tendant les décharges paroxystiques dans les neurones ictogéniques restent obscurs. Différentes possibilités ont été proposées.

Arguments pour une origine intrinsèque. L'hyperactivité des neurones ictogéniques pourrait résulter d'une sur-expression des canaux sodiques voltage-dépendant (Klein et al 2004). Une augmentation du nombre de ces canaux pourrait générer un courant entrant soutenu dépolarisant la membrane neuronale et, par conséquent, augmenter le taux de décharge des neurones ictogéniques et accroître leurs réponses à des entrées synaptiques excitatrices.

L'hyperactivité des neurones ictogéniques du cortex somatosensoriel pourrait également résulter d'une réduction du courant cationique entrant activé par l'hyperpolarisation (I_h) (Strauss et al 2004). Une diminution de I_h dans ces neurones pourrait faciliter la propagation des dépolarisations synaptiques dans l'arborisation dendritique, favorisant ainsi la sommation temporelle des entrées synaptiques répétées (Strauss et al 2004; Williams & Stuart 2000).

Ces différentes altérations des propriétés intrinsèques des neurones ictogéniques pourraient favoriser les dépolarisations et les décharges rythmiques au cours des DPO et renforcer secondairement la transmission synaptique excitatrice au sein du réseau cortical local (Watts & Thomson 2005).

Arguments pour une origine synaptique. Il est possible qu'une modification de la balance entre excitation et inhibition synaptique puisse aussi participer à l'hyperactivité des neurones ictogéniques. En effet, il a été notamment montré *in vitro* dans les neurones des couches profondes du néocortex du rat WAG/Rij : 1/ une augmentation de la conductance glutamatergique de type NMDA, générant une dépolarisation synaptique de grande amplitude et de longue durée favorisant les décharges en bouffées (D'Antuono et al 2006), 2/ une diminution de la transmission synaptique de type GABA_A (D'Antuono et al 2006) et, 3/ une altération de la fonction des récepteurs GABAergiques de type B présynaptiques (Inaba et al 2009). Dans les familles présentant des épilepsies idiopathiques incluant l'épilepsie-absence, plusieurs types de mutations du récepteur GABA ont été décrites (Hirsch & Panayiotopoulos 2005). Enfin, certaines souris exprimant des mutations pour le récepteur GABA_A montrent une propension élevée à générer des DPO (Tan et al 2007).

L'ensemble de ces altérations synaptiques, excitatrices et/ou inhibitrices, pourrait sous-tendre, au moins en partie, l'hyperexcitabilité des neurones ictogéniques du foyer cortical et donc leur prédisposition à générer des décharges épileptiques.

But spécifique de l'étude

Au cours de cette étude, j'ai exploré, pour la première fois *in vivo* dans un modèle génétique, le rôle du système GABAergique de type A dans les mécanismes ictogéniques corticaux de l'épilepsie-absence. A l'aide d'enregistrements conjoints EEG et intracellulaires *in vivo* dans le cortex somatosensoriel du GAERS, j'ai d'abord recherché la présence d'une composante synaptique chlore-dépendante (indice de l'activation des récepteurs GABA_A) dans les neurones pyramidaux du foyer cortical lors des crises. J'ai confronté ces potentiels GABAergiques de type-A à l'activité des interneurones inhibiteurs locaux afin de préciser le rôle des circuits inhibiteurs intracorticaux dans le contrôle des décharges ictogéniques initiant les DPO chez le GAERS.

Principaux résultats

Une dépolarisation membranaire, par injection de courant continu, des neurones pyramidaux du foyer cortical lors des crises a révélé la présence d'une hyperpolarisation membranaire, suivant une excitation synaptique brève, dont le potentiel d'inversion (~ -60 mV) était compatible avec un courant chlore et qui était plus négatif que le seuil de décharge de potentiel d'action. J'ai confirmé l'origine ionique de cette composante synaptique inhibitrice en réalisant des enregistrements intracellulaires à l'aide d'électrodes remplies de chlorure de potassium, qui avaient pour effet d'inverser le gradient électrochimique de l'ion chlore et de convertir les hyperpolarisations chlore-dépendante en dépolarisations membranaires. Ainsi, mes résultats suggèrent fortement l'existence d'une composante synaptique de type GABA_A au sein des activités paroxystiques des neurones ictogéniques. Afin de confirmer l'origine intracorticale de ces événements synaptiques inhibiteurs, j'ai enregistré l'activité intracellulaire des interneurones GABAergiques locaux, lesquels étaient identifiés par leurs propriétés électrophysiologiques spécifiques. La décharge de potentiels

d'action dans ces interneurons lors des crises coïncidait avec la composante chlore-dépendante identifiée dans les cellules pyramidales et survenait avec un délai d'environ 8 ms après la décharge des neurones ictogéniques.

Conclusions

Cette étude est, à notre connaissance, la première décrivant *in vivo* la participation de la transmission synaptique GABA_A dans les processus ictogéniques conduisant aux crises d'absence dans un modèle génétique. Nos résultats ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer la diminution de la transmission GABAergique de type A telle qu'elle a été montrée dans des expériences *in vitro* réalisées dans le cortex somatosensoriel d'un modèle génétique proche du notre (D'Antuono et al 2006). Un fait marquant de cette étude est que le potentiel d'inversion de la composante synaptique chlore-dépendante est similaire à celui calculé dans le néocortex chez des animaux non épileptiques (Wilent & Contreras 2004). De plus, le potentiel d'inversion du courant chlore dans nos expériences est plus négatif que le seuil de décharge de potentiels d'action dans les neurones pyramidaux ictogéniques. Ainsi, cette inhibition doit provoquer une hyperpolarisation dans les cellules pyramidales, contrecarrant ainsi la dépolarisation requise pour atteindre le seuil de décharge de potentiels d'action. Ce résultat diffère drastiquement de ceux obtenus *in vitro* dans d'autres formes d'épilepsie, notamment l'épilepsie du lobe temporal, où un dysfonctionnement des co-transporteurs chlore-potassium a pour effet de transformer la transmission GABA_A en transmission synaptique dépolarisante et pro-épileptogénique (Miles 2012). Enfin, les délais de décharge dans les interneurons suggèrent qu'ils sont activés secondairement par la décharge précoce des neurones pyramidaux produisant en retour une rapide inhibition de ceux-ci. Tel qu'il a été décrit dans d'autres systèmes oscillatoires (Cobb 1995), il semblerait donc que l'inhibition GABAergique au sein du foyer cortical du GAERS ait pour effet de contraindre la genèse des potentiels d'action des neurones pyramidaux dans une fenêtre temporelle relativement précoce et restreinte, ce qui aurait pour conséquence de favoriser la synchronisation de leur décharge et donc la propagation des activités paroxystiques au sein des réseaux cortico-corticaux et cortico-thalamiques.

CHLORIDE-MEDIATED INHIBITION OF THE ICTOGENIC NEURONES INITIATING GENETICALLY-DETERMINED ABSENCE SEIZURES

M. CHIPAUX,^{a,c} S. CHARPIER^{a,b*} AND P.-O. POLACK^{a1}

^aCentre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, UPMC/INSERM UMR-S 975, CNRS UMR 7225, Hôpital Pitié-Salpêtrière, F-75013, Paris, France

^bUPMC Univ Paris 06, F-75005, Paris, France

^cPaediatric Neurosurgery Department, Rothschild Foundation, 25 rue Manin, 75019 Paris, France

Abstract—Electroclinical investigations in human patients and experimental studies from genetic models demonstrated that spike-and-wave discharges (SWDs) associated with absence seizures have a cortical onset. In the Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg (GAERS), SWDs are initiated by the paroxysmal discharges of ictogenic pyramidal neurones located in the deep layers of the somatosensory cortex. However, the cellular and synaptic mechanisms that control the ictal discharges of seizure-initiating neurones remain unclear. Here, by the means of *in vivo* paired electroencephalographic (EEG) and intracellular recordings in the GAERS cortical focus, we explored the participation of the intracortical inhibitory system in the control of paroxysmal activities in ictogenic neurones. We found that their firing during EEG paroxysms was interrupted by the occurrence of hyperpolarizing synaptic events that reversed in polarity below action potential threshold. Intracellular injection of Cl[−] dramatically increased the amplitude of the paroxysmal depolarizations and the number of generated action potentials, strongly suggesting that the inhibitory synaptic potentials were mediated by GABA_A receptors. Consistently, we showed that intracellularly recorded GABAergic interneurones fired, during seizures, shortly after (~+8 ms) the discharge of ictogenic neurones and displayed a rhythmic bursting that coincided with the inhibitory synaptic events in neighbouring pyramidal ictogenic cells. In contrast with other forms of epilepsy, our findings suggest that paroxysmal activities in the cortical pyramidal cells initiating absence seizures are negatively controlled by a feedback Cl[−]-mediated inhibition likely resulting from the fast recurrent activation of intracortical GABAergic interneurones by the ictogenic cells themselves. © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: absence epilepsy, inhibition, epileptic focus, cortex, interneurones, GABA.

¹ Present address: Department of Neurology, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA.

*Correspondence to: S. Charpier, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, UPMC/INSERM UMR-S 975, CNRS UMR 7225, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 91 Boulevard de l'hôpital, F-75013, Paris, France. Tel: +33-1-40-77-99-16; fax: +33-1-40-77-99-13.

E-mail address: stephane.charpier@upmc.fr (S. Charpier).

Abbreviations: EEG, electroencephalogram; FS, fast-spiking; GAERS, Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg; IPSPs, inhibitory postsynaptic potentials; LTS, low-threshold spiking; SWD, spike-and-wave discharge.

0306-4522/11 \$ - see front matter © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.037

Absence seizures, mainly occurring in children of school age, result in transient impairments of consciousness, without convulsion, due to the abrupt appearance of spike-and-wave discharges (SWDs) over the cortical mantle and thalamic nuclei (Panayiotopoulos, 1997; Williams, 1953). Although the origin of SWDs was first attributed to functional disturbances in the intrinsic circuitry of the thalamus (Bal et al., 1995; Buzsáki, 1991), the most recent electroclinical studies in epileptic patients indicate that the onset of absence seizures is correlated with early activation of discrete cortical areas (Holmes et al., 2004; Sadleir et al., 2006; Westmijse et al., 2009). Cortical foci initiating SWDs have also been found in various rodent genetic models of absence epilepsy (Meeren et al., 2002; Polack et al., 2007, 2009). In the Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg (GAERS; Danober et al., 1998), the paroxysmal electrical activities first appear in a focus located within the facial somatosensory cortex (Polack et al., 2007). The functional inactivation of this ictogenic region prevents the occurrence of SWDs, whereas the inhibition of its related thalamic nuclei or remote cortical areas does not affect its endogenous ability to generate seizure activity (Polack et al., 2009).

Intracellular recordings in the GAERS revealed that SWDs are initiated in layer 5–6 pyramidal neurones of the cortical focus, which fire action potentials systematically before distant cortical and thalamo-cortical neurones (Polack et al., 2007, 2009). These ictogenic neurones display in between SWDs a distinctive sustained membrane depolarization and elevated tonic firing rate. This pattern of activity is converted during seizures into oscillatory-like paroxysmal depolarizations, leading to repeated brisk firing correlated with the electroencephalogram (EEG) spikes, superimposed on a tonic hyperpolarization lasting for the entire SWD (Polack et al., 2007, 2009; Polack and Charpier, 2009; see also Figs. 1B and 2A3). Moreover, intracortical or systemic injection in the GAERS of ethosuximide, a first choice anti-absence drug, has an anti-epileptic effect (Manning et al., 2004; Polack and Charpier, 2009) that is correlated with the conversion of the hyperactive ictogenic cortical neurones into cortical neurones having normal electrophysiological properties (Polack and Charpier, 2009).

The cellular and network mechanisms controlling the paroxysmal discharges in the cortical ictogenic neurones remain unclear. Investigations in rodent genetic models of absence epilepsy, mostly conducted in slice preparations where seizure activity is absent, pointed out dysregulations in intrinsic and/or synaptic properties that could account for the propensity of somatosensory cortical neurones to gen-

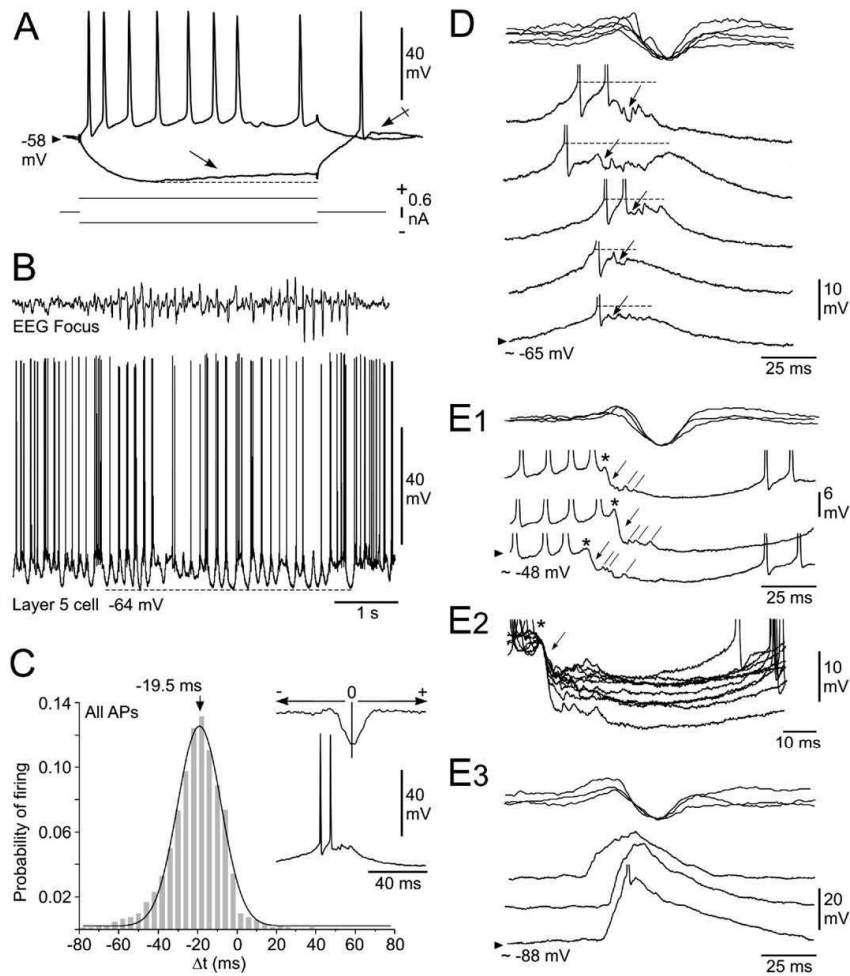


Fig. 1. Evidence for an inhibitory component during paroxysmal depolarizations in ictogenic neurones. (A) Intracellular responses (top records) to depolarizing and hyperpolarizing 200-ms current pulses (bottom traces) from a regular spiking neurone recorded in the layer 5 of the cortical focus. Note the sag in membrane voltage (arrow) during current-induced hyperpolarization and the rebound response at the break of the current pulse (crossed arrow). (B) Intracellular activity of the neurone shown in (A) (bottom traces) simultaneously recorded with the focus EEG (top traces). The occurrence of an SWD in the EEG was accompanied in the ictogenic neurone by rhythmic paroxysmal depolarizations, which were superimposed on a tonic membrane hyperpolarization (dashed line). (C) Pooled distribution of the timing (Δt) of all action potentials (APs; bin size, 4 ms) in ictogenic neurones ($n=12$), using the peak of the EEG spike as the zero-time reference (inset). The distribution was best fitted by a single Gauss-Laplace curve ($r^2=0.99$). Here and in the following figures, the mean value of action potentials timing is indicated at the top of the histogram. (D) Expanded dual records from the experiment shown in (B). The peak of the EEG spike was used to align the intracellular (bottom traces) and EEG records (superimposed top traces). The initial firing on the paroxysmal depolarizations was followed by near threshold (dashed lines) excitatory and inhibitory (arrows) synaptic events. (E) Voltage-dependency of paroxysmal depolarizations. (E1) Three successive intracellular records (bottom traces) from an ictogenic cell, obtained during DC injection of +1 nA, and the corresponding EEG spikes (superimposed top traces). Note the early depolarizing event (asterisks) followed by a brisk hyperpolarization (arrows) and subsequent bunches of small depolarizations (oblique lines). (E2) Superimposition ($n=10$) of the complex synaptic sequences during DC depolarization. The onset of the hyperpolarizing breaks (arrow), which disrupted the initial depolarization (asterisk), was used to align the records. (E3) Same representation as in (E1). The DC (−1 nA) hyperpolarization abolished the hyperpolarizing events and made emerge a large, up to 30 mV, depolarizing shift. In (D, E), action potentials are truncated for commodity. Here and in the following figures, the value of membrane potential is indicated by the arrowhead at the left of the intracellular record.

erate epileptic discharges. Specifically, the exacerbated activity of deep-layer neurones of the cortical focus could result from an increased expression of voltage-gated so-

dium channels (Klein et al., 2004) and/or a reduction in the dendritic hyperpolarization-activated inward cationic current (I_h) (Strauss et al., 2004). An increase in glutamatergic

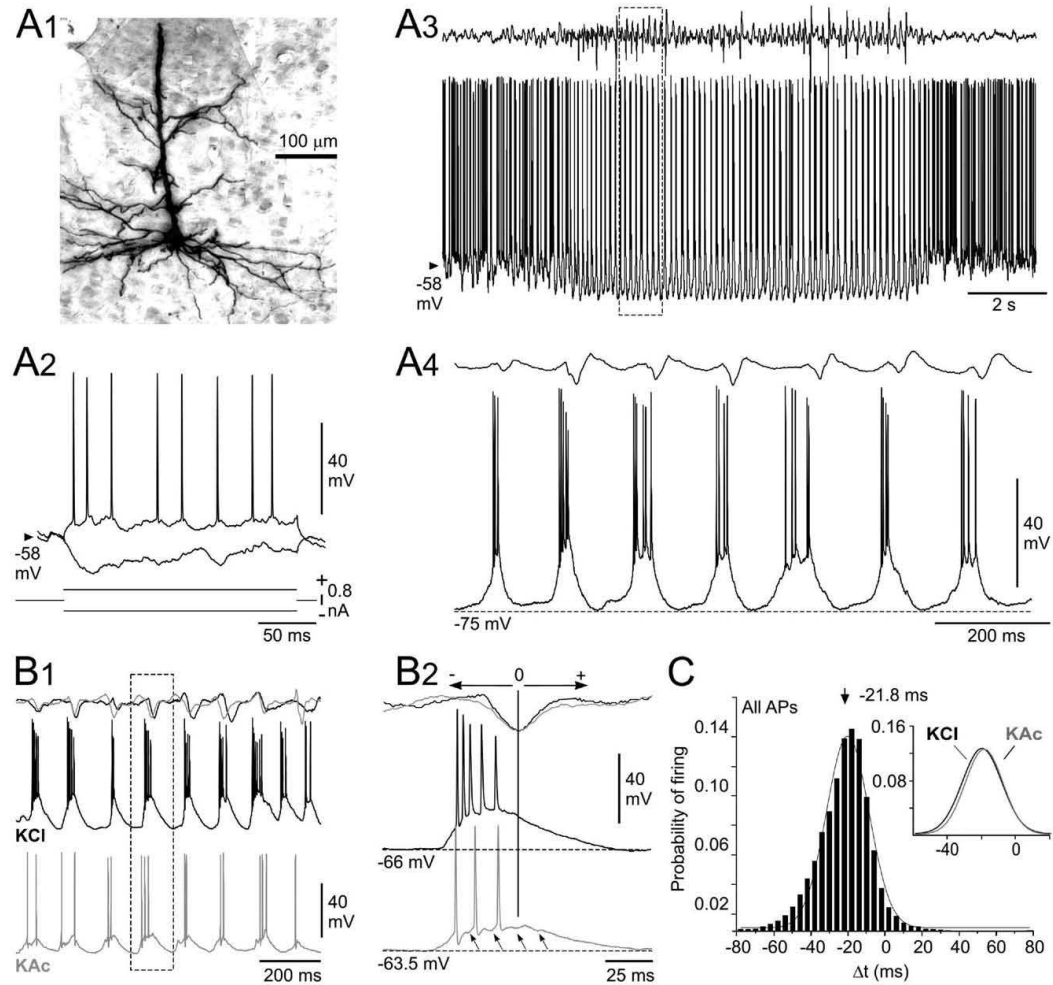


Fig. 2. Activity of cortical ictogenic neurons recorded with KCl-filled microelectrodes. (A) Morphological and electrophysiological properties of Cl⁻-loaded ictogenic neurones. (A1) Microphotograph of a Cl⁻-filled pyramidal neurone located in the layer 6 of the cortical focus. (A2) Voltage responses (top records) of the neurone shown in (A1) to depolarizing and hyperpolarizing current pulses (bottom traces). (A3) Spontaneous intracellular activity of the same neurone (bottom record) at the occurrence of an SWD in the related EEG (top record). (A4) Expansion of the paired recordings as indicated by the dashed box in (A3). The horizontal dashed line indicates the membrane potential reached during the seizure. (B) Increase of ictal firing rate after intracellular injection of Cl⁻. (B1) Seizure activity in ictogenic neurones, recorded with KCl (black bottom trace) and KAc (grey bottom trace) electrodes in the same experiment, and corresponding paroxysmal EEGs (top traces). (B2) Expansion of the paired records as indicated by the dashed box in (B1). The amplitude of depolarizing shift and firing rate in the Cl⁻-filled neurone (black trace) were both increased compared to those recorded with KAc electrode (grey trace). Note the small hyperpolarizing events in the KAc record (arrows), which disappeared when the cell was loaded with Cl⁻. (C) Pooled distribution of the timing (Δt) of all action potentials (APs; bin size, 4 ms) in Cl⁻-filled ictogenic neurones ($n=7$), using the peak of the EEG spike as the zero-time reference (B2). The distribution was best fitted by a Gauss-Laplace curve ($r^2=0.99$). The inset shows the superimposition of the fitting curves of firing distribution from pyramidal ictogenic neurones recorded with KAc (from Fig. 1C) and KCl electrodes.

NMDA-dependent conductance, together with a decrease in GABA_A receptor-mediated synaptic transmission, has also been proposed as a potent mechanism for the paroxysmal depolarizing shifts in focus neurones (D'Antuono et al., 2006). This mechanism is supported by the reduction in the number and duration of SWDs after *in vivo* microinjec-

tion of GABA_A positive allosteric modulators into the primary somatosensory cortex (Citraro et al., 2006). Moreover, the activation or blockade of group-II metabotropic glutamate receptors has a pro- or anti-epileptic effect, respectively, suggesting a role of these glutamate receptors in the pathogenesis of absence epilepsy (Ngomba et

al., 2005). Thus, converging data strongly suggest a crucial implication of the cortical glutamatergic and GABAergic synaptic systems in the generation of SWDs. However, the direct participation of a GABAergic component in the paroxysmal activity of the ictogenic neurones during absence seizures has never been explored.

Thus, the aim of the present study was to determine, by the means of *in vivo* paired EEG and intracellular recordings in the GAERS cortical focus, whether SWDs encompass an inhibitory synaptic component and to assess the role played by cortical inhibitory interneurons in the control of paroxysmal activities in ictogenic pyramidal cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

All animal experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and every precaution was taken to minimize stress and the number of animals used in each series of experiments.

Animal preparation

Experiments were performed *in vivo* on 17 adult (>15 weeks) GAERS. Animals were initially anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.; Sanofi, Libourne, France) and ketamine (100 mg/kg, i.m.; Imalgène, Merial, France). A cannula was inserted into the trachea, and the animal was placed in a stereotaxic frame. Wounds and pressure points were repeatedly (every 2 h) infiltrated with lidocaine (2%). Once the surgical procedures had been completed (see below), rats were analgesied and maintained in a narcotized and sedated state by injections of fentanyl (3 µg/kg, i.p.; Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France) repeated every 20–30 min (Charpier et al., 1999; Polack and Charpier, 2009; Polack et al., 2007, 2009). To obtain long-lasting stable intracellular recordings, rats were immobilized with gallamine triethiodide (40 mg, i.m., every 2 h; Specia, Paris, France) and artificially ventilated. The degree of anesthesia was assessed by continuously monitoring the surface EEG and heart rate, and additional doses of fentanyl were administered at the slightest change toward an awaked pattern (i.e. an increase in the frequency and reduction in the amplitude of the EEG waves and/or an increase in heart beat rate). Body temperature was maintained (36.5–37.5 °C) with a homoeothermic blanket. At the end of the experiments, animals received an overdose of sodium pentobarbital (200 mg/kg, i.p.).

Electrophysiological recordings

Surface EEG was made with a silver electrode (~60 kΩ) placed on the dura above the facial region of the somatosensory cortex, which was demonstrated as the ictogenic region (focus) in GAERS (Polack and Charpier, 2009; Polack et al., 2007, 2009). Reference electrode was placed in a contralateral head muscle. Intracellular recordings were performed using glass micropipettes filled with 2 M KAc (50–80 MΩ) or 3 M KCl (30–40 MΩ). Pyramidal cells and interneurons were recorded within the layer 5–6 of the facial somatosensory cortex from the vicinity (<200 µm) of the EEG electrode, at the following coordinates: 7–9 mm anterior to the interaural line, 5–6 mm lateral to the midline, and 1.1–3.3 mm under the cortical surface (Polack and Charpier, 2009; Polack et al., 2007, 2009).

Analysis

Intracellular recordings were obtained under current-clamp conditions using an Axoclamp-2B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Data were digitized for analysis at a sampling rate

of 10 kHz for the intracellular signal and 1 kHz for EEG. Apparent membrane input resistance was measured from the mean ($n \geq 10$) membrane potential change in response to -0.4 or -0.6 nA current pulses (200 ms duration, repeated every 1.25 s) and the corresponding membrane time constant was the time taken for the membrane potential to reach 63% of its final value. Average membrane potential was determined during interictal periods from continuous recordings of at least 10 s. The voltage threshold of action potentials was measured as the membrane potential at which the dV/dt exceeded 10 V.s^{-1} (Polack et al., 2009). Their amplitude (50–70 mV) was calculated as the potential difference between the voltage threshold and the peak of the waveform, and their total duration was measured from the threshold to the return to this voltage reference.

Numerical values are given as means \pm SEM. Statistical significance was assessed with appropriate statistical tests, Student's unpaired t-test, Mann-Whitney rank sum-test or Levene median test. In some measurements, a Gauss-Laplace fit was performed. Statistical analyses and curve fitting were performed with Origin 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

Morphological identification

Some of recorded neurones were labelled using an intracellular injection of 1% neurobiotin tracer (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) added to the pipette solution. Depolarizing current pulses (0.5–1 nA; 100–200 ms duration) were applied at a frequency of 1–2 Hz for a 15 min period. The histochemical methods used to reveal the morphology of neurobiotin-filled neurones are described in detail elsewhere (Polack and Charpier, 2006). The location of labelled neurones within the facial somatosensory cortex was determined using the atlas of Paxinos and Watson (1986).

RESULTS

SWD properties

The intra-SWD frequency was of 7.6 ± 0.2 Hz ($n=598$ SWDs from 17 GAERS). SWDs had a duration of 14.9 ± 2.4 s and recurred once every 19.9 ± 3.8 s. These temporal properties of SWDs, as well as the shape of individual spike-wave complexes, are similar to those described previously under analogous experimental conditions (Charpier et al., 1999; Paz et al., 2007; Polack et al., 2007, 2009; Polack and Charpier, 2009) and in freely moving GAERS (Danober et al., 1998; Polack et al., 2007).

The paroxysmal depolarizations in ictogenic neurones contain an inhibitory component

We first made *in vivo* intracellular recordings (using KAc electrodes) from the deep-layer pyramidal neurones ($n=12$ from eight GAERS) of the GAERS cortical focus, which were previously demonstrated as the neuronal trigger for cortico-thalamic SWDs (Paz et al., 2009; Polack and Charpier, 2009; Polack et al., 2007, 2009). Although the firing profile of focus pyramidal cells may vary in a state-dependent fashion, they displayed preferential current-evoked firing patterns, either regular spiking (Fig. 1A, $n=6$ neurones from five GAERS) or intrinsic bursting ($n=6$ neurones from three GAERS). Their mean input resistance and membrane time constant were $25.1 \pm 4.3 \text{ M}\Omega$ ($n=11$ neurones) and $7.4 \pm 1.0 \text{ ms}$ ($n=11$ neurones), respectively (Fig. 1A). In most neurones ($n=11$), injection of large

amplitude hyperpolarizing current pulses disclosed a depolarizing sag (Fig. 1A arrow), likely due to I_h , followed by a post-anodal depolarization (Fig. 1A crossed arrow), possibly provoked by the slow kinetics of I_h and/or by a low voltage-activated Ca^{2+} current (I_T). Interictal activity of ictogenic cells was characterized by a noisy-like fluctuating membrane potential, averaging -58.2 ± 0.7 mV ($n=12$ neurones) and generating a sustained discharge of action potentials (13.5 ± 1.8 Hz; $n=12$ neurones) (Fig. 1B) having a mean voltage threshold of -52.3 ± 0.7 mV ($n=12$ neurones).

The occurrence of an SWD was accompanied in focus neurones with rhythmic paroxysmal depolarizations, which had the same frequency as that of EEG spikes (7.5 ± 0.2 Hz, $n=12$ neurones), superimposed on a tonic membrane hyperpolarization, which lasted for the entire seizure and reached an average value of -69.9 ± 1.6 mV (from -77.2 to -61.6 mV, $n=132$ SWDs from 12 neurones) (Fig. 1B). The paroxysmal rhythmic depolarizations coincident with the EEG spikes were mostly (93%, $n=8826$ EEG spikes, $n=12$ neurones) suprathreshold, generating one to eight action potentials (1.8 ± 0.3 action potentials). The corresponding mean firing rate during seizures was of 10.8 ± 1.7 Hz (from 5 to 22.6 Hz, $n=12$ neurones) (Fig. 1B). The mean latency of the first action potential, relative to the peak negativity of the corresponding EEG spike (Fig. 1C, inset), was -24.4 ± 1.5 ms (from -32 to -13 ms, $n=8719$ action potentials from 132 SWDs, $n=12$ neurones) (Fig. 4D1 inset, grey line). A similar analysis using all action potentials led to a unimodal distribution with a mean value of -19.5 ± 1.4 ms ($n=23,627$ action potentials from 132 SWDs, $n=12$ neurones) (Fig. 1C). The patterns of neuronal activity, membrane properties and temporal relationships between cell discharge and EEG spikes, described above, are similar to those previously reported for ictogenic neurones initiating SWDs in the GAERS (Polack et al., 2007, 2009; Polack and Charpier, 2009).

A careful examination of the intracellular events concomitant with the EEG paroxysm (the "spike" component) revealed that the firing of ictogenic cells was interrupted by near threshold (~ -51 mV) upward and downward membrane potential fluctuations (Fig. 1D) resembling a mixture of excitatory and inhibitory synaptic events (Fig. 1D, arrows). To confirm the presence of an inhibitory component during EEG spikes, we made intracellular injection of DC depolarizing current (from 0.3 to 1 nA, $n=5$ neurones) to drive the membrane potential toward values (between -52 and -40 mV) expected to be less negative than the reversal potential of GABA_A receptor-mediated inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs) in somatosensory cortex pyramidal neurones, as calculated *in vivo* (~ -60 mV; Wilent and Contreras, 2004). This procedure unveiled a succession of synaptic events composed by an initial short depolarization (Fig. 1E1, E2, asterisks) abruptly interrupted by a hyperpolarization of 3–15 mV (Fig. 1E1, E2, arrows) having a fast kinetic (rise time < 10 ms; Fig. 1E2, arrow) consistent with that previously described for Cl⁻-dependent IPSPs in cortical neurones *in vivo* (Contreras et al., 1997; Timofeev et al., 2002). This fast hyperpolarization

was followed by a cluster of small amplitude synaptic depolarizations (Fig. 1E1, oblique lines) and a slow repolarization lasting 40–50 ms. Consistent with intermingled excitatory and inhibitory synaptic events, a steady hyperpolarization (between -80 and -90 mV) of neurones by DC injection (-1 nA, $n=5$ neurones) resulted in a dramatic increase in the amplitude of the depolarizing shift (Fig. 1E3), likely caused by a reversion of GABAergic currents together with an augmentation in the driving force of glutamatergic events.

Effects of intracellular injection of Cl⁻ on the activity of ictogenic neurones

We demonstrated the existence of a Cl⁻-dependent conductance in cortical focus pyramidal neurones (Fig. 2A1) during EEG paroxysms, and estimated its temporal properties, by making intracellular recordings ($n=7$ neurones from five GAERS) with KCl-filled microelectrodes. The mean interictal membrane potential of Cl⁻-loaded neurones (-56.3 ± 1.0 mV, $n=7$ neurones) was analogous to that calculated from neurones recorded with KAc electrodes ($P=0.2$). Their current-induced voltage responses were also similar (Fig. 2A2), with a roughly equal proportion of intrinsic bursting ($n=3$) and regular spiking ($n=4$) neurones (Fig. 2A2). However, Cl⁻-filled neurones had a higher mean interictal firing rate (33.5 ± 6.8 Hz, $n=7$ neurones; $P<0.05$) (Fig. 2A3), likely due to the occurrence of depolarizing Cl⁻-dependent IPSPs, a process that is consistent with the sustained spontaneous discharge of inhibitory interneurones in between seizures (see Fig. 4A).

During SWDs, Cl⁻-loaded neurones displayed rhythmic depolarizations (Fig. 2A3, A4), systematically suprathreshold and time-locked to the spike-and-wave complexes in the EEG (Fig. 2A4), superimposed on a tonic hyperpolarization reaching a mean value of -71.4 ± 2.4 mV ($n=109$ SWDs from seven neurones) (Fig. 2A3, A4). The hyperpolarizing envelop was maintained throughout the seizure (Fig. 2A3), indicating that it was not due to a Cl⁻-dependent conductance but rather to a synaptic disfacilitation, that is, a transient interruption in the tonic depolarizing synaptic drive (Charpier et al., 1999). As illustrated in the experiment shown in Fig. 2B, in which pyramidal neurones were recorded with KCl (black records) and KAc electrodes (grey records), the amplitude of paroxysmal depolarizing shifts was enhanced by Cl⁻ infusion, provoking an increase in the number of action potentials per EEG spike (3.6 ± 0.6 action potentials, from 4 to 11 action potentials, $n=7$ neurones; $P=0.009$) (Fig. 2B1, B2) that led to an augmentation in the mean ictal firing rate (25.7 ± 4.6 Hz; $n=7$ neurones, $P=0.04$) (Fig. 2B1).

In Cl⁻-loaded neurones, action potential discharge started -33.9 ± 6.6 ms (from -54.6 to -18.3 ms, $n=7$ neurones) relative to the spike component of SWDs, a value similar to that measured with KAc electrode ($P=0.2$) (see aligned records in Fig. 2B2). Although the cell firing in association with the EEG spikes was increased after Cl⁻ injection (see Fig. 2B1, B2), the mean latency of all action potentials (-21.8 ± 3.2 ms, from -30.0 to -11.2 ms, $n=32,777$ action potentials from 109 SWDs, $n=7$ neu-

rones) (Fig. 2C) remained unchanged ($P=0.2$) (Fig. 2C inset). Moreover, we did not find any significant difference ($P>0.05$) between the temporal dispersions of action potential distributions in ictogenic cells recorded with KAC and KCl electrodes. Thus, the increase of firing rate in Cl^- -filled neurones was due to additional depolarization reflecting a postsynaptic Cl^- -dependent conductance, likely GABA_A -mediated and temporally confined to the depolarizing shift associated with the EEG spike.

Rhythmic bursting in focus interneurons during absence seizures

We tested the hypothesis that the Cl^- -sensitive conductance in ictogenic neurones originated from intracortical GABAergic interneurons. We recorded from the two major classes of deep-layer GABAergic interneurons, the fast-spiking (FS) and low-threshold spiking (LTS) cells (Kawaguchi and Kubota, 1996, 1997), which produce a robust perisomatic and distal dendritic GABA_A receptor-mediated inhibition of layer 5 pyramidal cells, respectively (Xiang et al., 2002; Markram et al., 2004). These cells ($n=7$ from six GAERS) were identified on the basis of electrophysiological criteria (Markram et al., 2004), including the characteristics of their action potential and their distinctive current-evoked firing patterns, which were in accordance with their non-pyramidal morphology, closely resembling that of layer 5 GABAergic basket cells (Fig. 3A1) (Kawaguchi and Kubota, 1997).

FS interneurons ($n=4$ from three GAERS) fired action potentials of 0.7 ± 0.1 ms duration, with pronounced and brief after-hyperpolarizations (Fig. 3A2, B). FS cells displayed current-evoked trains of action potentials, with little adaptation and instantaneous frequencies of up to 500 Hz, which could be transiently interrupted by a slowly depolarizing ramp (Fig. 3B), as previously observed (Kawaguchi and Kubota, 1996). LTS cells ($n=3$ from three GAERS) produced action potentials of longer duration (1.1 ± 0.1 ms, Fig. 3A2) and fired repetitively, with a marked adaptation, when the depolarizing current pulse was applied from the rest (~ -58 mV) (Fig. 3C). In LTS cells, a low-threshold depolarization (Fig. 3C, arrow), which could provoke typical burst-like discharge (Fig. 3C, inset), was generated at the break of hyperpolarizing pulses (Fig. 3C) or in response to depolarizing pulses only when applied from a hyperpolarized membrane potential (below -65 mV, not shown). FS and LTS interneurons had an apparent input resistance of 25.8 ± 5.8 ($n=4$ neurones) and 21.1 ± 5.5 $\text{M}\Omega$ ($n=3$ neurones), respectively.

Both types of interneurons exhibited during interictal periods background membrane potential fluctuations, averaging -61.0 ± 1.4 mV ($n=7$ neurones), which provoked a spontaneous firing of 11.1 ± 4.4 Hz (Fig. 4A). As observed in pyramidal cells (see Fig. 1B), SWDs were concomitant in interneurons with rhythmic suprathreshold depolarizations, time-locked with the EEG spikes, superimposed on a membrane hyperpolarization (-69.2 ± 3.2 mV, $n=7$ neurones) that persisted throughout the seizure (Fig. 4A). The paroxysmal depolarizations in FS neurones were progressively sculpted by the temporal summation of small syn-

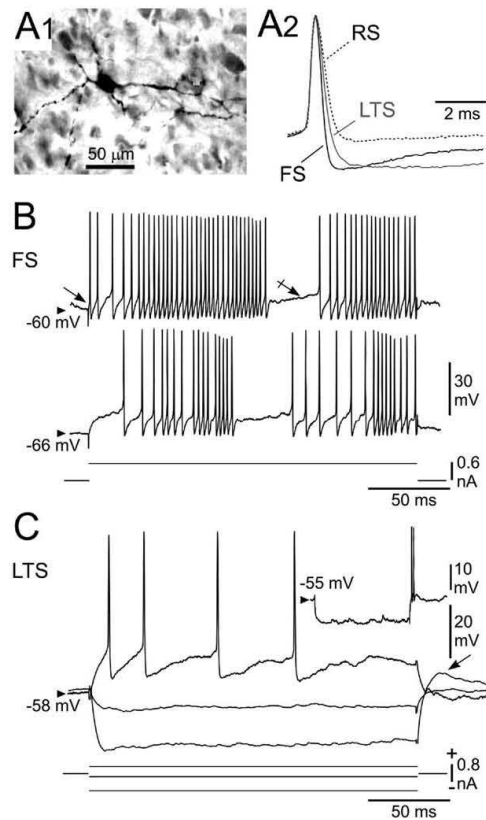


Fig. 3. Morpho-functional identification of GABAergic interneurons. (A1) Microphotograph of the somatodendritic region of a Neurobiotin-filled layer 5 neurone that displayed the morphological features of GABAergic basket cells (see Kawaguchi and Kubota, 1996). (A2) Superimposition of single action potentials recorded from RS, LTS and FS neurones. Amplitude of action potentials was normalized to highlight their different durations and distinct after-hyperpolarizations. (B) The FS cell showed an abrupt (arrow) discharge of high-frequency train of action potentials (top record), which could be momentarily suspended by a slow depolarizing ramp (crossed arrow), in response to suprathreshold current pulses (bottom trace). (C) Voltage responses of an LTS cell to negative and positive current pulses. The LTS cell showed a firing pattern with a marked adaptation when activated from rest (-58 mV). Note the post-anodal depolarization (arrow) at the break of the largest hyperpolarizing current, which could generate a burst of action potentials (inset, 200 ms-current pulse of -1 nA).

aptic events (Fig. 4B1, oblique lines and C, middle records), generating 2–11 action potentials with an instantaneous frequency ranging from 200 to 400 Hz (Fig. 4B1, C, middle records). In LTS cells, the paroxysmal shifts were composed of temporally summing high-frequency depolarizing synaptic potentials (Fig. 4B2, oblique lines) and a subsequent low-threshold spike giving rise to bursts of two to eight action potentials (Fig. 4B2).

In the experiments ($n=2$) in which regular spiking (pyramidal) and FS neurones were recorded in the same

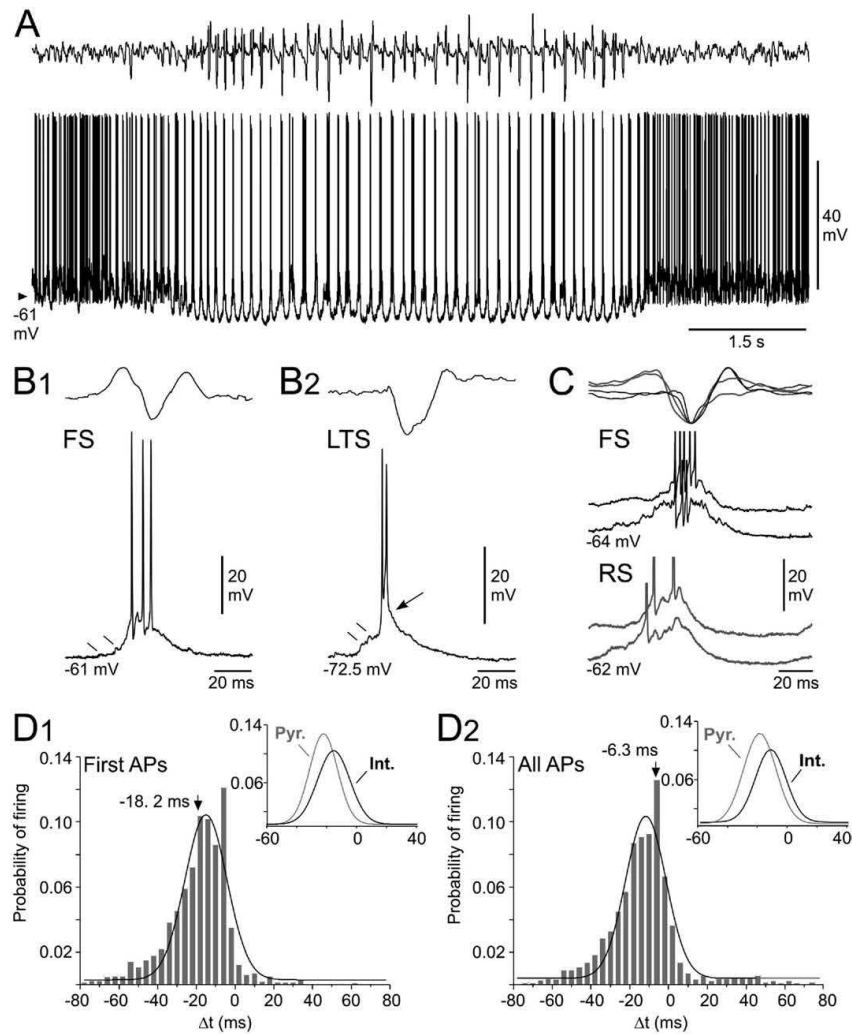


Fig. 4. Activity of cortical focus interneurons during SWDs. (A) Simultaneous recordings of the intracellular activity of an FS interneurone (same cell as in Fig. 3B) (bottom trace) and of the corresponding EEG (top trace). (B) Examples of paroxysmal depolarizations (bottom traces), coincident with the EEG spike (top records), recorded in FS (B1) and LTS (B2) neurones. In both cell types, the initial depolarization was sculpted by the temporal summation of brief depolarizing synaptic events (oblique lines), which were followed in the LTS cell by a low-threshold spike-like depolarization (arrow) crowned by a burst of action potentials. (C) EEG spikes (top records) and corresponding intracellular paroxysmal events ($n=2$) recorded in an FS cell (black traces) and in an RS neurone (grey traces) during the same experiment. Action potentials are truncated. (D) Temporal firing properties of interneurons in relation with EEG paroxysms. (D1) Pooled histogram (bin=4 ms) and Gauss-Laplace fit ($r^2=0.90$) showing the timing (Δt) of first action potentials (APs) ($n=7$ interneurons) relative to the peak negativity of the EEG spike (taken as time 0, see Fig. 1C). (D2) Same analysis as in (D1) using all action potentials during seizures ($n=7$ interneurons, bin=4 ms; r^2 of Gauss-Laplace fit=0.93). The mean values of the distributions are indicated. The insets in (D1, D2) show the superimpositions of Gauss-Laplace fits computed from ictogenic pyramidal cells (Pyr., grey lines) and focus interneurons (Int., black lines).

GAERS (Fig. 4C), the paroxysmal firing of the presumed GABAergic interneurons shortly followed that of the pyramidal cells and coincided with the late mixed synaptic potentials, which contain the inhibitory Cl^- -mediated synaptic component (see Figs. 1D and 2B2). The relatively delayed discharge of inhibitory interneurons during sei-

zures was statistically confirmed by the latency of their first action potential, using the EEG spike as the temporal reference (as indicated in Fig. 1C), which averaged -18.2 ± 3.3 ms ($n=3939$ action potentials from 289 SWDs, $n=7$ neurones) (Fig. 4D1), corresponding to a time-lag of $+7.9$ ms compared to the pyramidal cells (Fig. 4D1, inset).

Using all action potentials, the pooled distribution of firing probability in cortical interneurons was unimodally distributed with a mean value of -6.3 ± 6.0 ms (8693 action potentials, from 289 SWDs, $n=7$ neurones) (Fig. 4D2), corresponding to a significant ($P=0.003$) temporal delay of $+13.3$ ms compared to paroxysmal discharges in pyramidal ictogenic neurones (see Fig. 4D2, inset). Altogether, these findings indicate that the ictal firing of cortical interneurons shortly follows that of pyramidal ictogenic neurones and coincides with the Cl^- -mediated synaptic events.

DISCUSSION

The purpose of the present study was to explore the possible participation of the intracortical inhibitory system in the paroxysmal activity of cortical neurones initiating genetically-determined absence seizures. First, we found that DC depolarization of the ictogenic cells during seizures unmasked brief synaptic depolarizations disrupted by hyperpolarizing events, which may reflect GABA_A receptor-mediated IPSPs. This was subsequently confirmed by intracellular injection of Cl^- that dramatically increased the amplitude of the rhythmic depolarizations and the number of generated action potentials. The Cl^- -dependent conductance, overlapping the paroxysmal depolarization of ictogenic cells and limiting their firing rate, was correlated with the discharge of intracellularly recorded cortical interneurons. These findings suggest that epileptic discharges in ictogenic pyramidal cells are negatively controlled by a fast feedback Cl^- -dependent inhibition resulting from the recurrent activation of GABAergic interneurons.

GABAergic control of SWDs

The present study provides the first evidence for an inhibitory synaptic component in the cortical paroxysms during spontaneous, genetically-determined, SWDs. In a previous *in vivo* investigation from a pharmacological cat model of cortically-generated spike-and-wave activity, mimicking the Lennox–Gastaut seizures, it has been shown that the repeated firing of cortical GABAergic interneurons during seizures produced a prolonged opening of Cl^- channels in neighbouring pyramidal neurones, which resulted in an increase in the intracellular concentration of Cl^- and a positive shift in its reversal potential (Timofeev et al., 2002). In such a condition, the IPSPs become depolarizing and facilitate the development of seizures.

Here, we found that a Cl^- -dependent synaptic component coincides with the paroxysmal shift in ictogenic neurones but becomes inhibitory when the membrane potential approaches action potential threshold. Although the exact value of Cl^- reversal potential was not measured in our study, hyperpolarizing synaptic events could not be detected at potentials lower than ~ -62 mV but were clearly identified at potentials just below or slightly above action potential threshold (~ -51 mV) (see Figs. 1D, E1, E2 and 4C), strongly suggesting a reversal potential close to that calculated *in vivo* from non-epileptic somatosensory

cortex pyramidal neurones (~ -60 mV; Wilentz and Contreras, 2004).

According to the findings obtained in the present study, we can propose the following sequence of intracellular excitatory and inhibitory events in ictogenic neurones during SWDs. During a spike-and-wave complex, the initial component of the paroxysmal depolarizing shift is likely due to excitatory synaptic interactions between glutamatergic deep-layer pyramidal neurones of the focus, since this cell population fires before the other sources of excitatory inputs, such as pyramidal neurones located in the upper layers of the focus, pyramidal cells in distant cortical areas and thalamo-cortical afferents (Polack et al., 2007, 2009). We cannot exclude the subsequent participation of excitatory thalamic inputs, although the discharge of thalamo-cortical cells during absence seizures has been found relatively moderate (Paz et al., 2009; Polack et al., 2009). It is also plausible that the synaptic depolarization of focus pyramidal neurones be amplified by an increase in persistent voltage-gated Na^+ current (González-Burgos and Barrionuevo, 2001; Klein et al., 2004), which could also account for their elevated tonic firing and bursting activity (Aracri et al., 2006; Hutcheon et al., 1996). The membrane depolarization could be further facilitated by the fast activation, from the hyperpolarizing envelop, of I_{h} , which has been disclosed in the ictogenic cells during injection of negative current (Polack et al., 2009; see also Fig. 1A). Altogether, these synaptic and intrinsic processes could underlie the paroxysmal depolarization and the discharge of action potentials in ictogenic neurones during SWDs. The synaptically-induced firing of interneurons that rapidly follows ($\sim +8$ ms) the discharge of ictogenic neurones (see Fig. 4D1) strongly suggests a fast recurrent activation of interneurons by focus pyramidal neurones (Silberberg, 2008). In turn, the repeated bursting of interneurons during cortical paroxysms, while the membrane depolarization of postsynaptic pyramidal neurones exceeds the reversal potential of Cl^- , will produce a hyperpolarizing synaptic inhibition interfering with the synaptic excitation and limiting the firing of ictogenic cells. Such a negative GABAergic control of ictogenic neurones during paroxysmal depolarizing shifts is corroborated by the fast hyperpolarizing events that interrupt cell discharge (see Fig. 1D), the large-amplitude synaptic hyperpolarization unmasked by DC depolarization (see Fig. 1E1, E2), the firing of interneurons that largely coincides with the IPSPs and the strong Cl^- -dependent conductance in ictogenic cells (see Figs. 2B, C vs. 4D).

Somatosensory cortical neurones from non-epileptic rats, as well as GAERS cortical pyramidal neurones recorded outside the cortical focus, are more hyperpolarized and less active, during and in between SWDs, compared to GAERS pyramidal focus neurones (Polack et al., 2007, 2009; Polack and Charpier, 2009). It is thus plausible that the GABAergic inhibitory transmission within the focus, although efficient to limit the firing rate of ictogenic cells as demonstrated in this study, is partially altered (D'Antuono et al., 2006) compared to other cortical regions. Moreover, it is possible that the recruitment of rhythmic inhibitory

interneurons partly participates to the progressive slowing of the internal frequency of focus SWDs, from 10 to 12 Hz at the onset of paroxysm to a relatively stable 7 Hz oscillation during the main body of the seizure (Polack et al., 2007). Indeed, the relatively high amplitude and long duration of inhibitory synaptic conductance, compared to excitatory events (Haider et al., 2006), can rapidly decrease the frequency of cortical oscillations on a cycle-to-cycle basis (Atallah and Scanziani, 2009).

Functional consequences

The present findings demonstrate an active Cl^- -mediated synaptic inhibition of cortical cells during SWDs. This contrasts with other forms of ictal activities, such as temporal lobe seizures, in which a depolarizing shift in the Cl^- reversal potential in ictogenic neurones is responsible for a depolarizing and pro-epileptic effect of GABA_A synaptic inputs (Khalilov et al., 2003; Huberfeld et al., 2007). The opposite effect of the GABA_A ergic system in these two forms of epilepsy could also account, at least in part, for the relative exacerbated depolarization and firing rate in epileptogenic pyramidal hippocampal neurones *in vivo* as compared to GAERS cortical focus neurones (Fig. 2C in Langlois et al., 2010 vs. Fig. 1B).

During absence seizures, the rhythmic spiking activity of cortical GABA_A ergic interneurons evokes a substantial postsynaptic inhibition allowing ictogenic neurones to restrict their discharge within a relatively tight temporal window at the initial phase of the paroxysmal depolarization. This could effectively phase firing and oscillatory behaviour in the ictogenic pyramidal cells (Cobb et al., 1995) at the frequency of SWDs. Moreover, this GABA_A ergic mechanism could also promote the firing coherence among ictogenic pyramidal cells, by constraining the discharge of the pyramidal neurones population within a fixed time window, and thus facilitate the propagation and the generalization of epileptic activities in the cortico-thalamic networks (Paz et al., 2009; Polack et al., 2009).

The presynaptic inhibitory interneurons could also provide a potent intracortical system for seizure cessation. The transition from bursting to tonic discharge in thalamo-cortical neurones in the GAERS (Paz et al., 2007), which spontaneously occurs just before the end of the seizure (Paz et al., 2009), results in an interruption of SWDs that is correlated in layer 5 cortical neurones with a membrane hyperpolarization, a diminution in their firing rate and a reduction in their membrane input resistance. It is plausible that the increased tonic activity of thalamo-cortical cells, around the termination of seizures, causes a widespread feed-forward cortical inhibition by the massive recruitment of cortical GABA_A ergic interneurons (Swadlow, 2003). This would thus result in an increase in the membrane conductance of cortical ictogenic neurones and a powerful shunting inhibition of their excitatory synaptic inputs (Staley and Mody, 1992), repressing their endogenous propensity to maintain ictal activities.

Acknowledgments—This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR RO6275CS, 2006),

the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC-2010), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique and l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6). Mathilde Chipaux was supported by a Ligue Française Contre l'Epilepsie (LFCE) doctoral fellowship. We thank Dr. S. Mahon for thoughtful comments and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Araci P, Colombo E, Mantegazza M, Scalmani P, Curia G, Avanzini G, Franceschetti S (2006) Layer-specific properties of the persistent sodium current in sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 95:3460–3468.
- Atallah BV, Scanziani M (2009) Instantaneous modulation of gamma oscillation frequency by balancing excitation with inhibition. *Neuron* 62:566–577.
- Bal T, von Krosigk M, McCormick DA (1995) Role of the ferret perigeniculate nucleus in the generation of synchronized oscillations *in vitro*. *J Physiol* 483:665–685.
- Buzsáki G (1991) The thalamic clock: emergent network properties. *Neuroscience* 41:351–364.
- Charpier S, Leresche N, Deniau JM, Mahon S, Hughes SW, Crunelli V (1999) On the putative contribution of GABA_A receptors to the electrical events occurring during spontaneous spike and wave discharges. *Neuropharmacology* 38:1699–1706.
- Citraro R, Russo E, Di Paola ED, Ibbadu GF, Gratten S, Marra R, De Sarro G (2006) Effects of some neurosteroids injected into some brain areas of WAG/Rij rats, an animal model of generalized absence epilepsy. *Neuropharmacology* 50:1059–1071.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABA_A ergic interneurons. *Nature* 378:75–78.
- Contreras D, Destexhe A, Steriade M (1997) Intracellular and computational characterization of the intracortical inhibitory control of synchronized thalamic inputs *in vivo*. *J Neurophysiol* 78:335–350.
- D'Antuono M, Inaba Y, Biagini G, D'Arcangelo G, Tancredi V, Avoli M (2006) Synaptic hyperexcitability of deep layer neocortical cells in a genetic model of absence seizures. *Genes Brain Behav* 5:73–84.
- Danover L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C (1998) Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol* 55:27–57.
- González-Burgos G, Bamiounevo G (2001) Voltage-gated sodium channels shape subthreshold EPSPs in layer 5 pyramidal neurons from rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 86:1671–1184.
- Haider B, Duque A, Hasenstaub AR, McCormick DA (2006) Neocortical network activity *in vivo* is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. *J Neurosci* 26:4535–4545.
- Holmes MD, Brown M, Tucker DM (2004) Are "generalized" seizures truly generalized? Evidence of localized mesial frontal and frontopolar discharges in absence. *Epilepsia* 45:1568–1579.
- Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, Rivera C (2007) Perturbed chloride homeostasis and GABA_A ergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 27:9866–9873.
- Hutcheon B, Miura RM, Pail E (1996) Subthreshold membrane resonance in neocortical neurons. *J Neurophysiol* 76:683–697.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1996) Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABA_A ergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci* 16:2701–2715.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABA_A ergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476–486.
- Khalilov I, Holmes GL, Ben-Ari Y (2003) *In vitro* formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat Neurosci* 6:1079–1085.

- Klein JP, Khera DS, Nersesyan H, Kimchi EY, Waxman SG, Blumenfeld H (2004) Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy. *Brain Res* 1000:102–109.
- Langlois M, Polack PO, Bernard H, David O, Charpier S, Depaulis A, Deransart C (2010) Involvement of the thalamic parafascicular nucleus in mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 30:16523–16535.
- Manning JP, Richards DA, Leresche N, Crunelli V, Bowerly NG (2004) Cortical-area specific block of genetically determined absence seizures by ethosuximide. *Neuroscience* 123:5–9.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793–807.
- Meeren HK, Pijn JP, van Luijckelaar EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH (2002) Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* 22:1480–1495.
- Ngomba RT, Biagioni F, Casciato S, Willems-van Bree E, Battaglia G, Bruno V, Nicoletti F, van Luijckelaar EL (2005) The preferential mGlu2/3 receptor antagonist, LY341495, reduces the frequency of spike-wave discharges in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Neuropharmacology* 49 (Suppl 1):89–103.
- Panayiotopoulos CP (1997) Absence epilepsies. In: *Epilepsy: a comprehensive textbook* (Engel J, Pedley TA, eds), pp 2327–2346. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic.
- Paz JT, Chavez M, Saitlet S, Deniau JM, Charpier S (2007) Activity of ventral medial thalamic neurons during absence seizures and modulation of cortical paroxysms by the nigrothalamic pathway. *J Neurosci* 27:929–941.
- Paz JT, Polack PO, Slaght SJ, Deniau JM, Chavez M, Mahon S, Charpier S (2009) Cortical initiation of absence seizures, propagation to basal ganglia and back to the cortex. In: *Pan-brain abnormal neural network in epilepsy* (Tang FR, ed), pp 41–65. India, Kerala: Research Signpost.
- Polack PO, Charpier S (2006) Intracellular activity of cortical and thalamic neurones during high-voltage rhythmic spike discharge in Long-Evans rats *in vivo*. *J Physiol* 571:461–476.
- Polack PO, Charpier S (2009) Ethosuximide converts ictogenic neurons initiating absence seizures into normal neurons in a genetic model. *Epilepsia* 50:1816–1820.
- Polack PO, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A, Charpier S (2007) Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci* 27:6590–6599.
- Polack PO, Mahon S, Chavez M, Charpier S (2009) Inactivation of the somatosensory cortex prevents paroxysmal oscillations in cortical and related thalamic neurons in a genetic model of absence epilepsy. *Cereb Cortex* 19:2078–2091.
- Sadleir LG, Farrell K, Smith S, Connolly MB, Scheffer IE (2006) Electroclinical features of absence seizures in childhood absence epilepsy. *Neurology* 67:413–418.
- Silberberg G (2008) Polysynaptic subcircuits in the neocortex: spatial and temporal diversity. *Curr Opin Neurobiol* 18:332–337.
- Staley KJ, Mody I (1992) Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABAA receptor-mediated postsynaptic conductance. *J Neurophysiol* 68:197–212.
- Strauss U, Kole MH, Bräuer AU, Pahnke J, Bajorat R, Rolfs A, Nitsch R, Deisz RA (2004) An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci* 19:3048–3058.
- Swadlow HA (2003) Fast-spike interneurons and feedforward inhibition in awake sensory neocortex. *Cereb Cortex* 13:25–32.
- Timofeev I, Grenier F, Steriade M (2002) The role of chloride-dependent inhibition and the activity of fast-spiking neurons during cortical spike-wave electrographic seizures. *Neuroscience* 114:1115–1132.
- Westmijse I, Ossenblok P, Gunning B, van Luijckelaar G (2009) Onset and propagation of spike and slow wave discharges in human absence epilepsy: A MEG study. *Epilepsia* 50:2538–2548.
- Wilentz WB, Contreras D (2004) Synaptic responses to whisker deflections in rat barrel cortex as a function of cortical layer and stimulus intensity. *J Neurosci* 24:3985–3998.
- Williams D (1953) A study of thalamic and cortical rhythms in petit mal. *Brain* 76:56–69.
- Xiang Z, Huguenard JR, Prince DA (2002) Synaptic inhibition of pyramidal cells evoked by different interneuronal subtypes in layer V of rat visual cortex. *J Neurophysiol* 88:740–750.

(Accepted 11 June 2011)
(Available online 24 June 2011)

Chapitre 4 :

Discussion générale

1. Vers un schéma physiopathologique intégré des crises d'absence : Rôle de l'inhibition

Au cours de ma thèse, j'ai pu montrer le rôle des interneurons GABAergiques du cortex somatosensoriel dans le contrôle des activités ictogéniques. Les interneurons GABAergiques déchargent des potentiels d'action lors des crises, au même rythme que les pointes observées sur l'EEG, mais systématiquement juste après les décharges des neurones pyramidaux ictogéniques. Ils sont responsables de potentiels post-synaptiques inhibiteurs qui ont tendance à hyperpolariser les neurones ictogéniques vers des potentiels sous-liminaires pour la décharge de potentiels d'action. Les décharges paroxystiques sont donc contrôlées négativement par un feed-back inhibiteur résultant de l'activation rapide des interneurons GABAergiques intracorticaux par les neurones ictogéniques eux-mêmes. Ainsi, le système GABAergique au sein du foyer cortical a un effet limitant sur la décharge des neurones générateurs de crises.

- Les séquences d'activité cortico-thalamo-corticale initiant, maintenant et terminant les crises d'absence chez le GAERS

Les neurones ictogéniques chez les GAERS sont vraisemblablement limités aux neurones de la couche V du cortex somatosensoriel de la face. En effet, l'absence d'activité paroxystique des neurones thalamiques recevant des projections provenant du cortex somatosensoriel rend peu probable l'implication des neurones de la couche VI au cours de l'ictogénèse. Les neurones de la couche V du cortex somatosensoriel sont capables de générer physiologiquement des activités oscillatoires à 9-11 Hz lorsqu'ils sont dépolarisés de manière tonique (Amitai & Connors 1994; Silva et al 1991). Chez le GAERS, cette dépolarisation tonique est présente de manière anormalement fréquente, ce qui constitue une situation pathologique. Au

cours des premiers mois de vie de l'animal, il est vraisemblable que des oscillations physiologiques répétées et fréquentes modifient la connectivité dans le cortex somatosensoriel car l'activité du réseau est un facteur très important de la mise en place de la connectivité dans le cortex au cours du développement (Cancedda & 2007; Khazipov 2004; 2006). Ainsi, au cours des premiers mois de sa vie, le GAERS pourrait constituer au sein du cortex somatosensoriel, un réseau capable de recruter très rapidement dans des oscillations pathologiques un nombre suffisant de neurones pour constituer une masse critique capable d'entraîner d'abord les cortex avoisinants puis l'ensemble des boucles thalamo-corticales dans une décharge paroxystique. Une fois la crise démarrée au niveau du foyer cortical, les paroxysmes se propagent rapidement à l'ensemble des boucles thalamo-corticales. Il est vraisemblable que la faible activité des neurones thalamo-corticaux au cours des DPO (Charpier et al 1999; Paz et al 2007; Pinault 2003; Pinault et al 1998; Polack et al 2009; Timofeev & Steriade 2004) ait pour origine une forte inhibition provenant de la décharge rythmique intense des neurones du nRT (Pinault 2003; Slaght et al 2002a; Timofeev & Steriade 2004) provoquée par les entrées cortico-thalamiques. Cette forte entrée inhibitrice en hyperpolarisant les neurones thalamo-corticaux, active le courant I_h et déinactive le courant calcique à bas seuil (I_t) (Paz et al 2007; Pinault 2003; Polack & Charpier 2006; Polack et al 2009) mais la mise en jeu de ces conductances intrinsèques n'est généralement pas suffisante pour permettre un rebond d'excitation. Les décharges de bouffées de potentiels d'action sont générées lorsque les dépolarisations intrinsèques (par rebonds post-inhibiteurs) sont associées à des salves de PPSE à haute fréquence permettant au potentiel membranaire d'atteindre le seuil de décharge des potentiels d'action. Ainsi, la décharge des neurones thalamo-corticaux aurait pour effet de produire une excitation rythmique au niveau cortical, renforçant les oscillations au niveau du cortex et les synchronisations dans les boucles cortico-thalamo-corticales indispensables au maintien de la crise.

Les mécanismes de terminaison des DPO restent obscurs (Timofeev & Steriade 2004). Il est plausible que les décharges paroxystiques des neurones au cours des DPO produisent une forte entrée de calcium, qui va activer les courants potassiques calcium dépendants (Sah 2002) ce qui

pourrait diminuer l'excitabilité cellulaire et interrompre les activités épileptiques (Timofeev & Steriade 2004). Une diminution de la concentration extracellulaire en calcium (Amzica & Steriade 2000a) aurait également pour effet de diminuer la transmission synaptique et pourrait ainsi contribuer à l'arrêt des crises. Parallèlement à ces modifications de l'équilibre ionique local, des travaux réalisés in vivo sur le GAERS suggèrent que les ganglions de la base via leur projection de retour sur le cortex pourraient constituer un système de contrôle des crises d'absence (Deransart 2002; Paz 2009; Paz et al 2007; Paz et al 2005; Slaght et al 2004). En effet, la propagation des activités paroxystiques dans les ganglions de la base (Paz 2009; Paz et al 2007; Paz et al 2005; Slaght et al 2004) désynchronise l'activité des neurones thalamiques et réduit l'excitabilité cellulaire dans le cortex ce qui pourrait contribuer à terminer la crise (Paz et al 2007).

- Contrôle des DPO par le GABA

Une fois que la décharge épileptique corticale est enclenchée par les neurones pyramidaux ictogéniques, elle se propage aux interneurones locaux qui déchargent à leur tour des bouffées de potentiels d'action 8 ms seulement après la décharge des neurones pyramidaux, ce qui suggère une activation synaptique directe par les neurones ictogéniques (Silberberg 2008). En réponse, la décharge des interneurones va créer une inhibition synaptique limitant la décharge des neurones ictogéniques. Ils fourniraient ainsi un système intracortical de contrôle négatif des crises, intégré au sein d'un système d'arrêt plus global impliquant probablement le thalamus et les ganglions de la base.

Des données obtenues dans d'autres modèles d'épilepsies, chez l'homme et chez l'animal, suggèrent que le GABA pourrait, à l'inverse de nos données, contribuer aux activités épileptiques ictales et interictales. L'activation prolongée des récepteurs GABA_A pendant les décharges pourrait engendrer un déplacement vers un effet dépolarisant potentiellement excitateur du GABA qui aurait alors une action proconvulsivante (Pavlov 2012). Ce switch dans l'action du GABA est médié par les transporteurs du chlore NKCC1 et KCC2 dont l'expression est altérée chez les sujets épileptiques. Chez l'homme, l'expression de KCC2 est réduite dans les épilepsies du lobe

temporal avec sclérose hippocampique (Huberfeld et al 2007). Chez le rat juvénile, les décharges épileptiques régulent négativement KCC2. En conséquence, d'une part l'extrusion des ions chlorures peut être insuffisante pour maintenir l'homéostasie et les ions chlorures vont s'accumuler dans la milieu intracellulaire, d'autre part, le transporteur KCC2 va augmenter la concentration extracellulaire de potassium. Les modifications de concentration de ces deux ions vont majorer l'excitabilité neuronale et prolonger la décharge épileptique (Pavlov 2012).

Dans l'épilepsie-absence, il existe un dysfonctionnement de la régulation GABA. Ce dysfonctionnement n'est pas monomorphe au sein des différentes zones cérébrales : il existe une diminution de l'inhibition GABA_A dans le cortex, alors qu'elle est augmentée dans les neurones thalamo-corticaux (Crunelli et al 2012). L'augmentation de l'inhibition tonique GABA_A dans les neurones thalamo-corticaux est due à une accumulation de GABA extracellulaire en réponse à un dysfonctionnement du transporteur GABA astrocytique GAT-1 (Crunelli et al 2012). Ceci pourrait expliquer les aggravations des patients traités par des drogues GABAergiques.

Dans mes travaux sur l'épilepsie-absence et contrairement aux autres modèles d'épilepsie, le GABA n'apparaît ni excitateur, ni suffisamment inhibiteur pour bloquer les décharges ictogéniques. Il semble plutôt exercer une contrainte temporelle sur les décharges et favoriser ainsi la synchronisation des rythmes (Cobb 1995 ; Miles 2012).

Un autre mécanisme participant à l'interruption des crises est probablement le changement de mode de décharge dans le thalamus, dont les neurones passent d'un mode de décharge en bursts à un mode tonique, qui met fin à la rythmicité des décharges et permet de ramener le potentiel de membrane des neurones ictogéniques vers son potentiel d'équilibre (Paz 2009; Paz et al 2007).

Les ganglions de la base contribuent également à la terminaison des décharges. Les variations d'activité de la voie striatonigrale sont capables de moduler les oscillations pathologiques des circuits cortico-thalamiques. En effet, la fréquence de récurrence des crises d'absence est significativement réduite après injection d'agonistes GABA_A dans la substance noire réticulée, en réduisant l'activité des neurones nigraux qui ne peuvent alors plus inactiver les courants calciques à bas seuil

thalamiques (Depaulis 1988). La propagation des DPO vers le striatum et le sous-thalamus induit respectivement une inhibition des neurones GABAergiques striato-nigraux, et une activité rythmique glutamatergique dans les neurones sous-thalamo-nigraux, à son tour responsable de bouffées rythmiques dans les neurones GABAergiques nigro-thalamiques. L'interruption de la transmission excitatrice glutamatergique des neurones sous-thalamiques induit une diminution de la décharge des neurones nigro-thalamiques, conduisant à une désynchronisation des neurones thalamo-corticaux et à un arrêt des crises (Danover et al 1998; Paz et al 2007). En fin de crise, la diminution de décharge des neurones GABAergiques nigro-thalamiques conduit à une désinhibition et à une désynchronisation des neurones thalamo-corticaux entraînant une réduction d'excitabilité des neurones corticaux (Paz et al 2007; Paz et al 2005; Slaght et al 2004). Localement, comme décrit précédemment, des modifications de l'équilibre ionique participent à la terminaison des crises. Les décharges des neurones ictogéniques augmentent la concentration intracellulaire de calcium *via* une activation des canaux calciques voltage-dépendants. Le calcium va activer les canaux potassiques calcium-dépendants conduisant ainsi à une sortie de potassium et à une diminution de l'excitabilité cellulaire corticale (Timofeev & Steriade 2004). Une diminution de la concentration extracellulaire en calcium (Amzica & Steriade 2000b) pourrait également diminuer la transmission synaptique et contribuer ainsi à l'arrêt des crises.

2. Crises d'absence et intégration sensorielle

Au cours de cette thèse, j'ai examiné comment l'information issue de l'environnement est intégrée par le cortex au cours des crises d'absence, grâce à une étude translationnelle, chez l'homme et chez le GAERS, modèle animal génétique établi d'épilepsie-absence. Dans les deux espèces, les potentiels évoqués corticaux retrouvés en EEG restent présents pendant les absences. Chez le GAERS, les potentiels évoqués corticaux gardent les mêmes caractéristiques que les potentiels évoqués obtenus en interictal ou obtenus chez les individus non-épileptiques. Chez l'homme, leur amplitude est augmentée par les crises par rapport aux potentiels évoqués obtenus en

interictal. Chez le GAERS, j'ai pu compléter l'étude des réponses sensorielles évoquées par des enregistrements in vivo dans le cortex somatosensoriel primaire et j'ai montré que les réponses synaptiques évoquées par le mouvement des vibrisses sont également augmentées en amplitude au cours des crises, sans modification de latence. Ces données ne confirment donc pas l'abolition de l'intégration de l'information extérieure pendant les crises décrite dans les études antérieures (Duncan et al 2009; Kostopoulos 2001; Orren 1978). Au contraire, nos données démontrent que l'information issue de l'environnement peut toujours accéder au cortex au cours des crises d'absence.

- L'information sensorielle est propagée dans la boucle thalamo-corticale pendant les crises d'absence

Les potentiels évoqués corticaux persistent donc quand les stimuli sont appliqués en période critique. Par ailleurs, ces réponses évoquées ne semblent pas interférer avec le déroulement de la décharge épileptique, en tout cas, pour les intensités (10-60 PSI) de stimuli choisies dans cette étude. Il semble donc exister deux réseaux distincts : un réseau physiologique d'intégration de l'information sensorielle et un réseau pathologique générant les crises d'absence. Dans le deuxième réseau, les décharges épileptiques démarrent des couches profondes V et VI puis diffusent aux couches corticales plus superficielles et au thalamus, alors que dans le premier réseau, l'information sensorielle transite par les neurones thalamo-corticaux jusqu'à la couche intermédiaire IV (Fox 2008; Nicoletti & Fanselow 2002; Polack et al 2007; Polack et al 2009). Cependant, les différentes couches corticales au sein d'un tonneau sont étroitement interconnectées. Il est donc possible que des stimuli plus intenses ou d'une autre modalité sensorielle, puissent induire une désynchronisation des réseaux neuronaux pathologiques et interrompre les décharges épileptiques (Jung 1939; Paz 2009). Il est envisageable également que le timing entre les deux réseaux joue un rôle crucial. En particulier la différence de phase séparant les informations sensorielles (ou le stimulus initial) et le cycle des pointes-ondes pathologiques, pourrait générer une interaction entre les deux réseaux. Si l'information sensorielle arrive dans la couche IV précisément quand la diffusion des DPO issue des couches profondes y

parvient, les décharges ou l'information sensorielle pourraient être modifiées ou stoppées.

- L'information est traitée sans expérience consciente du stimulus proposé : crise d'absence ou crise de conscience ?

Même si les réponses évoquées par des stimuli sensoriels peuvent être observées pendant les crises, le sujet n'y répond pas. Le premier niveau d'intégration corticale est pourtant préservé : la persistance des potentiels évoqués lors des crises atteste la possibilité d'un accès à l'information, pourtant, il n'existe plus de perception consciente (Tsai et al 2010; Wang et al 2005a). Une hypothèse est que les oscillations synchronisées dans la boucle thalamo-corticale pourraient empêcher les perceptions conscientes en filtrant les stimuli externes et/ou en empêchant leur diffusion vers le cortex adéquat pour leur intégration (Kostopoulos 2001; Llinas & Steriade 2006; Steriade 2000; Timofeev & Steriade 2004). J'ai montré que l'information continue à accéder au cortex somatosensoriel. J'ai également remarqué que l'information peut être transmise au cortex moteur adjacent (données non publiées), avec la même latence qu'en période interictale et la même latence que chez les rats non-épileptiques. En dehors de l'épilepsie, d'autres études ont démontré la persistance de l'intégration de l'information sensorielle alors que le sujet est incapable d'y répondre, par exemple au cours du sommeil non-REM, alors que des oscillations rythmiques occupent la boucle thalamo-corticale (Dang-Vu et al 2011; Schabus et al 2012). Même chez des patients porteurs d'une cécité corticale, qui par définition ne sont pas conscients du stimulus visuel présenté, des potentiels évoqués visuels peuvent être enregistrés en regard du cortex occipital (Wyganski-Jaffe 2009). De même, chez les patients dans le coma, les potentiels évoqués restent mesurables y compris dans les stades de coma végétatif profond; ils sont utilisés comme marqueur pronostic de la gravité du coma et du devenir fonctionnel du malade (Bruno MA 2011; Fischer 2005). Ces patients sont éveillés, mais restent aréactifs aux stimulations extérieures, alors que les mesures neurophysiologiques prouvent que cette information est bien intégrée au niveau cortical. L'incapacité à générer une sensation consciente et une réponse motrice pendant les crises d'absence pourrait être liée à une atteinte localisée aux aires associatives corticales

(Blumenfeld 2005; 2012; Blumenfeld et al 2003; Cavanna & Monaco 2009). En effet, des investigations en imagerie ont montré une modification du signal cortical relativement focale pendant les crises, uniquement en frontal latéral et en pariétal (Blumenfeld et al 2009; Hamandi et al 2006). Les données animales ont prouvé que la genèse des DPO a pour origine une zone corticale restreinte au cortex somatosensoriel. Elles sont très peu visibles dans les structures corticales postérieures. L'absence d'accès à la conscience ne semble donc pas être un phénomène impliquant l'ensemble du cerveau, mais semble plutôt liée à des déficits cognitifs spécifiques, prédominant dans le cortex frontal. La forte connectivité entre les deux hémisphères frontaux accélère la diffusion des DPO à l'hémisphère controlatéral et pourrait expliquer que l'absence d'accès à la conscience soit rapide et le plus souvent total sans impliquer forcément les autres lobes corticaux (Heo et al 2006).

La question de l'impact de la durée des crises doit également être soulevée. La rupture de contact survient souvent avec un court délai par rapport au début de la décharge de pointes-ondes. Ceci pourrait suggérer que la première pointe-onde n'entraîne pas d'altération du contact, mais la répétition des décharges au niveau cortical frontal, et probablement leur diffusion vers les structures sous-corticales, pourrait en être responsable. Plusieurs éléments sont en faveur de la seconde hypothèse : les patients porteurs d'une épilepsie-absence présentent fréquemment de courtes bouffées de pointes-ondes diffuses, identiques aux décharges associées à leurs crises. Ces bouffées courtes sont considérées comme asymptomatiques, ou sont trop courtes pour qu'une symptomatologie associée soit visible par les témoins. Leur durée pourrait être trop brève pour altérer la conscience du sujet (Blumenfeld 2012). Enfin, un dernier argument serait que la rupture de contact ne survient qu'au moment où l'activité au sein du thalamus se modifie en imagerie fonctionnelle, alors que les modifications corticales sont intervenues plusieurs secondes avant le début du symptôme (Berman et al 2010; Li et al 2009; Moeller et al 2010b). La question de la durée des crises reste controversée, il est possible que nous ne disposions pas des moyens adéquats pour identifier une rupture de contact très courte, inférieure à quelques secondes. Pour certains, la rupture de contact pourrait être visible dès que la décharge dure

au moins une seconde, si tout est mis en œuvre pour la mettre en évidence (Berman et al 2010; Blumenfeld 2012).

Enfin, la fenêtre temporelle entre deux complexes de pointes-ondes est courte (< 500 ms chez l'homme), en comparaison de la latence d'un potentiel évoqué cortical (200-300 ms). Lorsque le stimulus survient pendant une décharge de pointes-ondes liée à une crise d'absence, il est donc fréquent que le potentiel évoqué soit immédiatement suivi par une pointe-onde, qui pourrait interférer sur le délai nécessaire à l'établissement d'une expérience consciente (Libet et al 1967).

3. L'épilepsie-absence, une épilepsie généralisée idiopathique ?

En tant que neuropédiatre, mon objectif en réalisant ce travail, était de mieux comprendre la physiopathologie d'une épilepsie fréquente parmi la population pédiatrique. Pendant ma thèse, j'ai appris que chez l'animal, l'épilepsie-absence est une épilepsie focale à généralisation immédiate. La question est maintenant de savoir si cette notion est applicable à la pathologie humaine, pour ensuite analyser les liens entre ce « foyer » épileptogène entouré d'un cortex « sain » et la physiopathologie de la genèse des crises.

- La notion de foyer est-elle applicable à la pathologie humaine ?

Les explorations chez l'homme sont éthiquement limitées aux explorations non-invasives dans ce syndrome en raison de sa « bénignité ». De plus en plus d'études utilisent les différentes avancées de l'imagerie fonctionnelle (EEG haute résolution, IRM fonctionnelle, MEG) pour étudier les DPO de l'épilepsie-absence. Elles ont été détaillées dans le chapitre sur l'origine des crises d'absence. Les modifications de signal ou de métabolisme au cours des crises impliquent à la fois le cortex et le thalamus. Au niveau cortical, l'implication ne semble pas diffuse, mais prédomine en antérieur, en frontal et/ou en pariétal. Il semble donc que, comme dans les modèles animaux, les crises d'absence dans la pathologie humaine, ne soient pas liées à l'embrassement d'emblée massif du cortex, mais soient plutôt liées à une décharge « focale » très rapidement généralisée. Cette diffusion quasi-

immédiate survient grâce à l'implication extrêmement rapide de la boucle thalamo-corticale, et du cortex frontal bilatéral, via les connexions très nombreuses entre les deux lobes frontaux. Nous sommes à la limite de la résolution temporelle des examens d'imagerie actuels, ce qui rend difficile la mise en évidence du début focal sans le recours aux enregistrements profonds. L'augmentation depuis quelques années du nombre d'électrodes lors des EEG réalisés, en particulier chez les enfants, ainsi que l'utilisation des techniques numériques, et des méthodes de localisation de sources permettront d'améliorer encore la résolution des examens non-invasifs (Holmes et al 2004).

Des enregistrements profonds de patients avec épilepsie-absence ont été réalisés en d'autres temps. Le premier enregistrement a eu lieu en 1954 par des électrodes profondes thalamiques. Il permit de recueillir des DPO dans le thalamus en période critique. J. Bancaud et J. Talairach ont enregistré dès 1965, grâce à des électrodes profondes multiples, un point de départ frontal puis une synchronisation bilatérale généralisée sous forme de DPO à 3 Hz (Bancaud 1965). Ils ont même pu reproduire les crises des patients par des stimulations sur les électrodes implantées dans la zone épileptogène. Il existe également de rares enregistrements intracrâniens plus récents réalisés chez des patients porteurs d'une épilepsie-absence et d'une épilepsie focale, sans lien à priori. Ces patients ont été implantés avec des électrodes profondes au cours d'un bilan préchirurgical de leur épilepsie focale et leurs crises d'absence ont pu être enregistrées. Les crises d'absence débutent sur un nombre restreint d'électrodes et n'embrasent pas d'emblée toutes les électrodes. Il s'agirait de décharges plutôt multifocales frontales que monofocales, sous réserve du nombre limité d'électrodes et de l'exploration de zones corticales limitées (données non publiées).

L'ensemble des enregistrements décrits ci-dessus est plutôt en faveur d'une origine corticale mono- ou multifocale frontale des crises d'absence.

- L'épilepsie-absence au sein de la classification des syndromes épileptiques

Rôles et intérêts de la classification syndromique actuelle

L'épilepsie-absence est donc très probablement générée chez l'homme dans une ou plusieurs zones corticales restreintes, plutôt antérieures, avant que les DPO ne se généralisent par l'intermédiaire de la boucle thalamo-corticale et par diffusion intracorticale directe. Chez l'animal, l'inactivation de cette région focale ou sa résection chirurgicale supprime les activités paroxystiques locales et propagées. Cela paraît difficilement compatible avec l'acceptation que l'épilepsie-absence appartient à la famille des épilepsies d'emblée généralisées. Cependant, ces données ne sont pas contradictoires avec la dernière version de la classification des syndromes épileptiques, révisée en 2010 par la Ligue Internationale Contre l'Epilepsie. Les crises généralisées sont maintenant définies comme un engagement très rapide de réseaux bilatéraux, corticaux et/ou sous-corticaux, mais n'impliquant pas nécessairement l'ensemble du cortex. Cette classification a pour intérêt principal de guider le clinicien dans le pronostic et la thérapeutique à entreprendre. Le choix de la molécule thérapeutique, en particulier, est différent pour les crises généralisées et pour les crises partielles. Leur effet thérapeutique peut même être opposé ; par exemple la carbamazépine améliore les crises partielles, mais peut aggraver les épilepsies généralisées. Ceci sous-entend des mécanismes physiopathologiques différents, encore partiellement inconnus, qui ont guidé l'établissement de cette classification. Il est donc important que l'épilepsie-absence reste classée dans la famille de syndromes épileptiques avec lesquels elle partage des hypothèses physiopathologiques et une pharmacosensibilité en commun, afin de faciliter la prise en charge des patients.

Analogie avec les épilepsies généralisées secondaires

L'épilepsie-absence serait donc une épilepsie généralisée secondaire à l'activation d'une zone corticale restreinte. Une analogie pourrait naître avec les épilepsies généralisées secondaires, par exemple, les spasmes infantiles. Comme l'épilepsie-absence, les spasmes infantiles sont classés parmi les épilepsies généralisées dans la classification internationale. Comme dans

l'épilepsie-absence, l'hypothèse physiopathologique d'une origine sous-corticale a été défendue pendant longtemps. Actuellement, les avancées en EEG et en imagerie ont permis de faire évoluer le concept d'épilepsie d'emblée généralisée (ou primaire), vers le concept actuel que certains spasmes infantiles sont en fait des crises focales avec généralisation secondaire (Chugani et al 2010). Asano et ses collaborateurs ont mis en évidence chez certains enfants présentant des spasmes infantiles, une pointe initiale focale, suivie d'une diffusion du pattern épileptique sous forme d'une onde lente très ample. Les spasmes pourraient donc être déclenchés dans certains cas, comme les crises d'absence, par un foyer focal néocortical visible sous forme d'une pointe focale initiale, et la diffusion secondaire rendrait compte de la symptomatologie stéréotypée qui est alors indépendante de la topographie de la pointe initiale (Asano et al 2005). Chez l'adulte, une décharge focale se traduit cliniquement par une symptomatologie liée à la topographie de la décharge puis à ses voies de propagation. Alors que chez le petit enfant, une décharge focale peut s'exprimer sous forme de spasmes infantiles stéréotypés, dont l'expression clinique ne semble liée ni au point de départ, ni aux voies de propagation empruntées par la décharge. L'explication de cette différence d'expression clinique entre l'adulte et l'enfant est dépendante de l'âge de survenue précoce (le plus souvent avant l'âge de 1 an) des spasmes infantiles dans un cerveau en cours de maturation, dont la myélinisation ne s'achèvera pas avant plusieurs années. Il est admis que dans 30% des cas, les spasmes résultent d'une lésion corticale plus ou moins étendue. Dans ce cas, quand les enfants peuvent être opérés, plus des deux tiers ne présentent plus de spasmes, ce qui montre l'implication directe de la lésion dans la symptomatologie (Asano et al 2001).

Par analogie avec les spasmes infantiles, épilepsie généralisée pouvant être secondaire à une lésion plus ou moins focale, l'épilepsie-absence pourrait être une épilepsie généralisée secondaire à un dysfonctionnement focal lié à l'âge. Ce dysfonctionnement lié à la maturation cérébrale pourrait se résoudre à la fin de la maturation, ce qui correspond à l'adolescence et entraînerait la guérison de l'épilepsie. Dans les deux pathologies, le syndrome évolue avec l'âge de l'enfant et les crises s'éteignent le plus souvent, pour laisser l'enfant libre de crises, ou pour laisser apparaître un

autre syndrome épileptique propre à un âge plus avancé: syndrome de Lennox-Gastaut pour les spasmes infantiles, autre épilepsie généralisée idiopathique dans l'épilepsie-absence.

4. Perspectives : Aspects maturationnels du foyer ictogénique

L'épilepsie-absence se modifie avec l'âge, elle débute par un intervalle de temps libre de crises dans les premières années de vie, et évolue finalement vers la guérison ou vers un autre syndrome épileptique. Pourtant, elle est très probablement liée à une atteinte génétique probablement multigénique présente dès la période embryonnaire. Les crises apparaissent pourtant avec un intervalle libre de plusieurs années chez l'homme et d'un à trois mois chez l'animal. Il est possible que pendant cette période dépourvue de crise, des modifications maturationnelles se mettent en place au sein du foyer qui deviendra ictogénique. Une première hypothèse serait que l'hyperactivité des neurones ictogéniques à l'origine des DPO s'exprime dès la naissance mais reste asymptomatique, en raison d'un contrôle par d'autres mécanismes. Une autre hypothèse serait que l'hyperactivité peut n'apparaître qu'après plusieurs années, au moment où les crises d'absence débutent, après des modifications physiopathologiques progressives aboutissant à la mise en place de l'hyperactivité neuronale. Les neurones ictogéniques deviendraient alors capables de générer des décharges de potentiels d'action anormales ou se mettraient à diffuser, au sein de la boucle cortico-thalamo-corticale, des décharges épileptiques qu'ils produisaient déjà depuis la naissance. Dans le modèle animal des GAERS, les DPO avec manifestations cliniques critiques associées sont détectées vers le trentième jour de vie. Cependant, plusieurs éléments étayaient l'hypothèse que les modifications qui régissent l'apparition des crises se mettent en place progressivement, 1/ les premières décharges sont plus rares (1 à 2 par heure) et plus courtes (1 à 3 secondes) que chez les GAERS adultes (Depaulis 2006), 2/ 30% seulement des GAERS présentent des crises au quarantième jour de vie, alors qu'ils sont 100% à l'âge de 3 mois (Depaulis 2006) et 3/ des décharges d'ondes lentes encochées de pointes, infracliniques ont été enregistrées dès le seizième jour de vie ; elles vont

prendre progressivement un aspect rythmique et mature vers le trentième jour (données présentées par S. Girod au congrès européen d'épilepsie en 2010). Pour évaluer la cinétique de maturation du foyer et son éventuel retentissement sur les réseaux neuronaux physiologiques adjacents, il serait intéressant de pouvoir effectuer des enregistrements intracellulaires in vivo chez des rats GAERS avant l'apparition des crises, et ainsi analyser les propriétés intrinsèques des « futurs » neurones ictogéniques de la couche V du cortex somatosensoriel et les propriétés synaptiques des réseaux neuronaux corticaux et thalamiques. Il est bien sûr peu probable qu'on puisse un jour intervenir chez les enfants avant l'apparition des crises d'absence, en raison de l'absence de symptômes pendant la période de latence, sauf peut-être dans les familles d'épilepsie idiopathiques avec épilepsie-absence, où une surveillance EEG rapprochée pourrait être proposée. En revanche, connaître les mécanismes qui sous-tendent l'apparition des crises lors de la maturation pourrait aider à comprendre les mécanismes physiopathologiques des crises matures et éventuellement orienter vers de nouvelles molécules thérapeutiques. Ceci pourrait faire l'objet d'une prochaine étape de la recherche dans les modèles animaux génétiques de crises d'absence.

Synchrotron x-ray interlaced microbeams suppress paroxysmal oscillations in neuronal networks initiating generalized epilepsy

Benoît Pouyatos, PhD^{1*}, Raphaël Serduc, PhD¹, Mathilde Chipaux, MD, PhD^{2,3}, Tanguy Chabrol¹, Elke Bräuer-Krisch, PhD⁴, Christian Nemoz, PhD⁴, Hervé Mathieu, PhD¹, Olivier David, PhD¹, Luc Renaud⁵, Yolanda Prezado, PhD⁴, Jean-Albert Laissue, MD, PhD⁶, François Estève, MD, PhD¹, Stéphane Charpier, PhD³ and Antoine Depaulis, PhD^{1,2}

¹ Grenoble Institut des Neurosciences - Inserm U836, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

² Service de Neurochirurgie pédiatrique, Fondation Rothschild, Paris, France.

³ Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, UPMC/INSERM, UMR-S 975; CNRS UMR 7225, Paris, France.

⁴ European Synchrotron Research Facility, Biomedical beamline ID17, Grenoble, France.

⁵ Centre de Recherche Cerveau et Cognition, CNRS UMR 5549, Toulouse, France.

⁶ Institute of Pathology, University of Bern, Switzerland

Keywords: Epilepsy; Animal model; Spike-Wave discharges; Radiotherapy; Synchrotron x-ray microbeams; intracellular recordings; in vivo

Abbreviations:

S1Cx: Primary Somatosensory Cortex;

MoCx: Primary Motor Cortex;

VLTN: Ventrolateral Thalamic Nuclei;

GAERS: Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg;

IntMRT: Interlaced Microbeam Radiation Therapy;

MB: Microbeam;

SWDs: Spike-Wave Discharges;

LFPs: Local Field Potentials;

EEG: Electroencephalogram;

MRI: Magnetic Resonance Imaging.

ABSTRACT

Radiotherapy has shown some efficacy for epilepsies but the insufficient confinement of the radiation dose to the pathological target reduces its indications. Synchrotron-generated x-rays overcome this limitation and allow the delivery of focalized radiation doses to discrete brain volumes *via* interlaced arrays of microbeams (IntMRT). Here, we used IntMRT to target brain structures involved in seizure generation in a rat model of absence epilepsy (GAERS). We addressed the issue of whether and how synchrotron radiotherapeutic treatment suppresses epileptic activities in neuronal networks. IntMRT was used to target the somatosensory cortex (S1Cx), a region involved in seizure generation in the GAERS. The antiepileptic mechanisms were investigated by recording multisite local-field potentials and the intracellular activity of irradiated S1Cx pyramidal neurons *in vivo*. MRI and histopathological images displayed precise and sharp dose deposition and revealed no impairment of surrounding tissues. Local-field potentials from behaving animals demonstrated a quasi-total abolition of epileptiform activities within the target. The irradiated S1Cx was unable to initiate seizures, whereas neighboring non-irradiated cortical and thalamic regions could still produce pathological oscillations. *In vivo* intracellular recordings showed that irradiated pyramidal neurons were strongly hyperpolarized, displayed a decreased excitability and a reduction of spontaneous synaptic activities. These functional alterations explain the suppression of large-scale synchronization within irradiated cortical networks. Our work provides the first post-irradiation electrophysiological recordings of individual neurons. Altogether, our data are a critical step towards understanding how X-ray radiation impacts neuronal physiology and epileptogenic processes.

INTRODUCTION

Synchrotron X-ray sources have been used for different medical applications among which brain radiosurgery appears as one of the most promising (Dilmanian et al., 2006). By taking benefit of the synchrotron beam's unique properties (high flux of photons, negligible divergence and a lateral dose-off about 200 times steeper than conventional radiotherapy), it is possible to shape quasi-parallel 25-50- μm -thick microbeams (MBs) that can deliver high-doses of radiation deep in the brain within short exposure times (Anschel et al., 2010; Serduc et al., 2010). These arrays of MBs are surprisingly well tolerated by brain tissue, especially by the vascular system, which is very sensitive to ionizing radiation (Serduc et al., 2006). By interlacing these MBs (Fig 1A; Movie S1), it is possible to deposit high doses of radiation into discrete regions of rat brains, with almost no incidence on the neighboring tissue (Serduc et al., 2010) (Fig 1B,C and E). We called this new method *Interlaced Microbeam Radiotherapy* (IntMRT). The submillimetric precision of targeting combined to the preservation of surrounding tissue makes IntMRT clinically attractive for all pathologies that require circumscribed destruction and/or inactivation of small brain regions, even if close to eloquent or vital structures.

Until now, IntMRT has been applied to brain tumors (Serduc et al., 2010; Bouchet et al., 2010) but other non-cancerous pathologies, such as epilepsy, might benefit from the use of synchrotron MBs. Indeed, epileptic seizures generally arise from restricted brain volumes that can often be identified by non-invasive methods, but surgical

resection, although very effective (Engel, 1996; Kahane, 2004), cannot always be performed. Radiotherapeutic irradiation of epileptic foci using Gamma-Knife® or Linacs has shown some efficacy, but the lateral dose fall-off (Fig 1B) is often insufficient to deposit adequate doses in the target when sensitive/eloquent structures are adjacent (Sims et al., 1999; St George et al., 2002). Given its unique precision (Serduc et al., 2010), IntMRT may overcome these limitations.

Several studies in patients (Prayson & Yoder, 2007; Rheims et al., 2011) and animals models (Mori et al., 2000; Maesawa et al., 2000; Chen et al., 2001) suggest that an antiepileptic effect may be obtained after irradiation even when the structure targeted is not necrotized. This non-destructive radiotherapeutic effect could be partly caused by biochemical alterations and neuromodulation, yet the cellular mechanisms remain elusive (Rheims et al., 2011; Quigg et al., 2012). Here, we took advantage of the sharp dose fall-off of IntMRT to investigate the functional effects of X-ray radiation on ictogenic neurons, and the result of their inactivation on the seizure onset and its propagation. One of the prerequisite for such experiments was to target an epileptic tissue with well-identified ictogenic neurons, and no cell loss and/or sclerosis to facilitate the assessment of radiation-induced changes. For these reasons and because it allows both long term seizure monitoring and access to the ictal activity of individual neurons (Polack et al., 2007), we chose to perform IntMRT in the Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS), a strain that displays spontaneous spike-wave discharges (SWDs) reminiscent of human absence seizures (Danober et al., 1998). We targeted bilaterally the so-called "cortical focus", i.e. the somatosensory cortex (S1Cx; Fig 1C,D), as well as two structures involved in the propagation and maintenance of SWDs (Fig S1), i.e. the motor cortex (MoCx) and the ventro-lateral thalamic nuclei (VLTN). In each animal, we verified the correct targeting by T1-weighted magnetic resonance within the two weeks that followed IntMRT and examined their general behavior by standard tests to detect possible side effects. During the 4 months following irradiation, we monitored weekly the seizures in freely moving animals by recording local-field potentials (LFPs) from depth electrodes implanted in the three target regions. Finally, we investigated the mechanisms underlying the antiepileptic effect by performing *in vivo* intracellular recordings of individual irradiated neurons of the S1Cx.

MATERIAL AND METHODS

Animals.

Fourteen adult female GAERS were bilaterally irradiated in the S1Cx, 3 in the MoCx and 11 in the VLTN. Two S1Cx-irradiated rats were used for intracellular recordings. Twenty-eight GAERS were non-irradiated controls, including 14 for intracellular recordings. We performed all experiments in accordance with the Directive 86/609/EEC after validation by our local ethical committee.

Beam alignment and IntMRT

We performed IntMRT at the European Synchrotron Radiation Facility (ID17 Biomedical Beamline) as previously described in detail (Serduc et al., 2010). Anaesthetized GAERS were positioned on a y -axis rotation stage installed above a goniometer. X-ray projection images (35-60 keV) of the rat head were acquired to delineate the irradiation fields defined from the bregma. The light was shaped into an array of parallel MBs (50- μm -wide, 200 μm on-center distance, 16000 Gy. s^{-1} beam flux, 50-350

keV spectrum). Each radiation target (coordinates in Fig 1D) received 4 irradiation ports separated by a 45° angle and a 50-µm step, both applied along the y-axis to generate a solid dosimetry in the interlacement region (Fig 1A; Movie S1). The MB entrance dose was 200 Gy. We assessed volumic dose in a rat head phantom for each target (Fig 1B) by using PENELOPE-2006 Monte Carlo code (Prezado et al., 2009; Salvat & Fernández-Varea, 2006). We calculated the ratios between the valley doses within and outside the interlaced targets (Fig 1D).

Behavioral tests.

Two weeks after IntMRT, we estimated sensorimotor coordination using an accelerating paradigm (4-40 rpm, 5 min) on the Rotarod® (Panlab/Harvard Apparatus) by averaging the latencies to fall off the rotating rod (3 trials). The same day, rats were placed in the center of an open-field arena for 20 min and locomotion was video-tracked and quantified.

Magnetic resonance (MR) imaging

Two weeks after IntMRT, we obtained 7T-MRI (Bruker Biospec Avance III) in all rats. We characterized brain vessel permeability using a T1w sequence (TurboRARE. TR: 1300 ms, effective TE: 7.7 ms, FOV: 30x30 mm, matrix: 256x256, slice thickness: 0.5 mm) acquired 5 min after intravenous injection of Gadolinium (200 mmol.kg⁻¹, Dotarem, Guerbet).

LFP monitoring in freely moving rats

Sixteen days post-irradiation, we implanted rats with two supra-dural screws (fronto-parietal) and three bipolar depth electrodes in the right S1Cx, MoCx and VLTN (same coordinates as the centers of the irradiation targets specified in Fig 1D). We monitored LFPs weekly (1 h) from the 4th to the 16th post-irradiation week using System-Plus Evolution® (Micromed) and quantified SWDs. At 8 weeks post-irradiation, we acquired LFPs with high-sampling rate (5 kHz) on 2-3 rats/group for qualitative assessment of SWD characteristics using a headstage preamplifier (MPA8I; Multi Channel Systems) connected to a multichannel amplifier (FA32I; Multi Channel Systems). Seizures were automatically detected by filtering EEG power in all channels between 6-9 Hz and correcting baseline for mean and standard deviation estimated from the 2 s preceding SWDs. We extracted local maxima of baseline-corrected filtered EEG, and defined seizure onset/termination as the first/last local maximum with amplitude above 6. This procedure was repeated for each electrode in order to calculate delays of propagation of SWDs. For each SWD, we obtained the power of oscillatory activity between 1 and 50 Hz using Morlet wavelet transform. We normalized Time-Frequency maps by subtracting the mean of the baseline to the data, and dividing demeaned data by the standard deviation of the baseline. The degree of statistical ($P < 0.001$) association between LFPs from the S1Cx, MoCx and VLTN bipolar electrodes was determined by calculating the mean nonlinear correlation coefficient h^2 (Lopes da Silva et al., 1989; Wendling et al., 2009) between each pair of electrodes during the first 2 s of representative SWDs ($n=17-30$). The directionality of the dependence between two electrodes a and b was obtained by calculating the difference between $h^2_{a>b}$ and $h^2_{b>a}$.

In vivo intracellular recordings

We obtained *in vivo* intracellular recordings from non-irradiated ($n = 14$) and S1Cx-irradiated GAERS ($n = 2$) two months following irradiation. Rats were initially anesthetized with sodium pentobarbital and ketamine (40/100 mg.kg⁻¹), then maintained by additional doses of fentanyl, as previously described (Polack et al., 2007). We obtained cortical local field potentials (LFPs) using two low-impedance silver

electrodes placed on the *dura* above the S1Cx and MoCx. Intracellular recordings were performed using glass micropipettes filled with 2 M potassium acetate (50–70 M Ω). Membrane input resistance was measured from the linear portion of the voltage-current relationships, which were constructed by the mean ($n = 10-20$) membrane potential changes induced by a wide range (-0.2 to -1 nA) of hyperpolarizing current pulses. The membrane time-constant was the time taken for a -0.4nA-induced membrane potential deflection to reach 63% of its final value. Amplitude fluctuations of background membrane potentials were quantified by their standard deviation computed from subthreshold spontaneous activities of 10s duration. We recorded S1Cx cells at 0.1/1.7 mm posterior, 5/6 mm lateral from the bregma, and 0.9/3.3 mm under the cortical surface. Intracellular recordings were obtained under current-clamp using the active bridge mode of an Axoclamp-2B amplifier (Molecular Devices). Data were digitized using Spike 2 (Cambridge Electronic Design) at 10 kHz (intracellular signal) or 1 kHz (EEG). Action potentials were characterized as previously described (Polack et al., 2007). Cross-correlograms between intracellular activities and LFPs were calculated using Spike 2.

Statistical analyses

Characteristics of intracellular recordings were analyzed using Mann-Whitney tests. Seizure number and durations were analyzed using 2-way repeated-measure ANOVAs, with Bonferroni's post-tests. $P = 0.05$ was considered as the significance threshold. All values are given as mean \pm SEM.

Histopathological analyses.

Short-term histochemical evaluation of irradiation was performed two months post-irradiation by myelin staining using a modified gallyas silver impregnation. We used a classic Nissl staining for visualization of cellular body damage.

RESULTS

IntMRT allows high-precision dose delivery in restricted brain regions with minimal behavioral side effects

MRI acquired 14 days after bilateral S1Cx, MoCx or VLTN (Figs 1C,D and S1) irradiations showed strong, sharply delimited, hypersignals in the regions where MBs interlaced, suggesting an alteration of the vascular integrity and micro-ruptures of the blood-brain barrier within the targets. These images denote a precise targeting and an effective sparing of tissue irradiated with non-interlaced MBs. Two months after IntMRT, we observed no major histological damage outside the interlaced targets, including the regions traversed by a single array of MBs. Occasionally, the tracks of individual MBs appeared on Nissl-stained sections (Fig 1E *left panels*; arrowheads) as thin clear stripes spaced $\approx 200 \mu\text{m}$ apart. At low magnification, Nissl staining appeared heterogeneous in the S1Cx region, reflecting a variable decrease in cell density. On high-magnification images, neurons were often damaged with signs of cell death (white arrow) and neuronophagia (*). After IntMRT, myelin sheaths (*right panels*) appeared fragmented, focally forming argyrophilic fragments (>) and myelin ovoids (#). Myelin fiber structures lost their anisotropy after irradiation and displayed "honeycombing" figures. This histological pattern was in agreement with our previous observations (Serduc et al., 2010). We did not detect any significant deleterious effect of irradiation on sensorimotor behavior in any of the three irradiated groups, as compared to the non-irradiated animals (Fig S2).

S1Cx bilateral IntMRT irradiation induces a decrease of cumulated seizure duration

Freely-moving LFP monitoring was performed until the 14th week post-irradiation in GAERS implanted with depth electrodes in the S1Cx, MoCx and VLTN. Control GAERS displayed SWDs arising abruptly from normal EEG background on all channels with an average of 74.4 ± 2.2 SWD/h lasting 18.1 ± 0.35 s (Fig 2A; 204 h of recording, 13,230 SWDs). Four weeks after treatment, animals bilaterally irradiated in the S1Cx displayed SWDs 48% shorter than those of non-irradiated animals ($P < 0.001$), although their number remained approximately the same. This effect, which persisted until the end of the monitoring period, resulted in a significantly reduced cumulated seizure duration in animals irradiated in the S1Cx compared to control animals (grand mean: 12.9 ± 0.53 vs. 22.3 ± 0.70 min/h, respectively; $P < 0.01$). Irradiation of the VLTN also induced a long-lasting reduction of the average SWD duration ($P < 0.001$), but significantly increased their number ($P < 0.001$), which resulted in a cumulated seizure duration similar to controls ($P > 0.05$). Bilateral IntMRT Irradiation of the MoCx did not induce any significant change in seizure number ($P > 0.05$) nor duration ($P > 0.05$).

IntMRT prevents epileptic activities in the targeted regions

In non-irradiated animals, SWDs were characterized by a 25-50-fold increase of the power in the 6-9 Hz frequency band on all channels compared to interictal periods (Fig 2B,C). The bilateral delivery of 200 Gy in any of the three brain targets resulted in a near complete abolition of SWDs on the LFPs recorded from these structures (Fig 2B,C). The average power in the 6-9 Hz frequency band was decreased by 93, 74 and 88% in the irradiated S1Cx, MoCx and VLTN, respectively, when compared to LFP signals recorded from homologous structures in non-irradiated animals (Fig 2C). The strongly altered SWDs recorded in the irradiated structures will be then referred as "residual paroxysmal oscillations" (RPOs). We also observed that the irradiated targets were unable to initiate/lead SWDs, as shown by the delays of propagation of SWDs (Fig S3A) and the non-linear interdependence (h_2 ; Fig S3B) between the recorded structures.

Membrane excitability and background synaptic activity are altered in irradiated S1Cx pyramidal neurons

Recorded neurons located in the infra-granular layers of the S1Cx (Fig 3B, right inset) exhibited the intrinsic firing patterns (regular spiking or intrinsic bursting) (Fig 3D,E) and action potential properties (Fig 3D, inset) of pyramidal cells. These neurons belong to the neuronal population previously identified as the trigger for SWDs in GAERS (Polack et al., 2007; Polack et al., 2009). Non-irradiated S1Cx neurons ($n = 19$) displayed large-amplitude synaptic fluctuations between SWDs, corresponding to a mean membrane potential of -60.0 ± 0.9 mV and resulting in a sustained (11.2 ± 1.5 Hz) spontaneous firing (Fig 3A,H). Eight S1Cx neurons were intracellularly recorded two months after IntMRT in two rats. These cells displayed a significant ($P < 0.001$) membrane hyperpolarization (Fig 3C,H) associated with a collapse in the firing rate (Fig 3B,H), 5 out of 8 neurons becoming silent (Fig 3B). These effects were associated with a dramatic decrease in the standard deviation of the background synaptic activity (non-irradiated, 5.2 ± 0.4 mV, $n = 19$ neurons vs. irradiated, 1.6 ± 0.2 mV, $n = 8$; $P <$

0.0001; Fig 3C), which was mainly composed of miniature-like depolarizing events (Fig 3B, left *inset*). The great reduction in the spontaneous firing of irradiated neurons did not result from an alteration in the intrinsic processes of spiking since the amplitude, duration and voltage threshold of action potentials were not significantly modified ($P > 0.05$; Fig 3D, *inset*).

IntMRT had a complex effect on membrane excitability. We found a significant attenuation in the neuronal input-output relation, as evidenced by the reduced firing rate in response to +0.4nA current pulses (non-irradiated cells, 45.4 ± 8.6 Hz, $n = 11$ neurons *vs.* irradiated, 22.4 ± 7.0 Hz, $n = 5$; $P < 0.05$; Fig 3D,E). These effects likely resulted from the membrane hyperpolarization rather than from a diminution of the membrane input resistance since this excitability parameter, measured by the slope of the linear voltage-current relationship (Fig 3F,G), was significantly increased in irradiated neurons ($P < 0.05$; Fig 3H). In contrast, the passive membrane time constant, which defined the temporal window over which synaptic potentials can sum (Rall, 1969; Spruston et al., 2007), was significantly decreased ($P < 0.05$; Fig 3E *inset* and H).

The antiepileptic effect of IntMRT is associated with a lack of synchronized neuronal oscillations in the S1Cx

We further explored the cellular mechanisms of IntMRT by comparing the intracellular activities of irradiated S1Cx cells during RPOs with those occurring during SWDs in non-irradiated GAERS. In control cells, we recorded oscillatory suprathreshold depolarizations (Fig 4A,C) superimposed on a sustained membrane hyperpolarization (-4.6 ± 0.8 mV) lasting for the entire duration of the SWD (Fig 4A). As indicated by the strong cross-correlation between the LFP and intracellular waveforms (Fig 4C), SWDs resulted from synchronized spatiotemporal oscillations in the underlying cortical synaptic network. This rhythmic activity was completely disrupted by IntMRT since only short periods of RPOs persisted in the LFP recordings (Fig 4B). Concomitantly, the membrane potential was significantly more hyperpolarized than in control neurons during SWDs ($P < 0.05$; Fig 4B,F). During RPOs, most irradiated neurons remained silent ($n = 6$ neurons), but summation of erratic synaptic depolarizations could cause a scattered firing ($n = 2$, Fig 4B,E Irradiated). The cross-correlation between intracellular activities of irradiated S1Cx cells and RPOs indicated a weak temporal coherence between the two signals (Fig 4D) and suggested a lack of synchronization among cortical cells.

Altogether, our *in vivo* intracellular recordings of S1Cx irradiated neurons demonstrated a global decrease in the membrane excitability, along with a spatiotemporal disorganization of the ongoing synaptic activity and the disappearance of synchronized oscillations. These coherent/synergistic changes likely explain the local suppression of SWDs.

DISCUSSION

In the GAERS model of generalized epilepsy, we applied a novel method of radiotherapy utilizing the unique properties of synchrotron X-ray MBs. We took advantage of the excellent precision and sharp lateral dose gradient provided by the IntMRT geometry to investigate for the first time the post-irradiation activities of

ictogenic neurons, and the consequence of their inactivation on global seizure initiation and propagation.

IntMRT reduces the excitability and synchronization of S1Cx neurons

Our *in vivo* intracellular recordings within the irradiated S1Cx indicated that the integrative properties and firing output of pyramidal neurons were significantly affected. The concomitant membrane hyperpolarization, the increase in apparent membrane input resistance and the reduction in membrane time constant could partly result from a decrease in the total cell membrane area after irradiation. Indeed, such structural alteration may reduce the number of ion channels available for current to leak through the membrane and decrease the membrane capacitance, therefore accelerating the initial rate of change of trans-membrane voltage. Consistent with this hypothesis, increase in membrane input resistance, decrease in membrane capacitance and cell hyperpolarization have been described in cortical pyramidal neurons after dendrotomy (Bekkers & Häusser, 2007). Our results thus suggest an alteration of neuronal morphology with a reduction of the total membrane surface, as observed in hippocampal pyramidal cells in slices from neonatally irradiated rats (Czéh et al., 1999). However, the increase in the cells' input resistance also indicates that the severed neuronal membrane, possibly caused by a direct effect of ionizing radiations, was able to reseal. The reduction of spontaneous synaptic events in irradiated neurons might also participate in the enhancement of both membrane resistance and polarization (Destexhe & Paré, 1999) as previously described in the GAERS (Polack et al., 2009). It is also conceivable that the concomitant effects on synaptic and membrane properties could result, at least in part, from the alteration of the cation current I_h since its blockade in epileptic slices decreases the occurrence of spontaneous epileptiform events together with an increase in resting membrane potential and apparent input resistance (Inaba et al., 2006).

Despite these alterations in their passive membrane properties, irradiated neurons were still capable to fire action potentials similar to those of homologous neurons in non-irradiated rats. This is consistent with the persistence of high-frequency, current-evoked, neuronal discharges in cortical slices from irradiated rats (Zhou et al., 2009). However, in our study, the responsiveness of irradiated cells for a given stimulus was substantially attenuated, indicating a global decrease in their intrinsic excitability that was mainly due to the membrane hyperpolarization. The spontaneous activity of irradiated S1Cx cells is also considerably dampened in-between and during the RPOs. In particular, the depolarizing background synaptic activities were diminished in amplitude and frequency, a finding in accordance with the reduced rate of excitatory synaptic events found in irradiated neocortical networks (Xiang et al., 2006). Here, the decline in the excitatory synaptic drive of irradiated S1Cx was likely due to a partial loss of local excitatory neurons and to an alteration of axonal myelination affecting the propagation of synaptic activities. These structural changes together with the membrane hyperpolarization and the shorter membrane time constant were likely responsible for the low spontaneous firing and the lack of paroxysmal depolarizing shifts. Consequently, this may have precluded the synchronization among cortical cells and the generation of fully-developed SWDs.

IntMRT: a unique tool to investigate the focal effects of x-ray radiation.

A review of the literature reveals that the *focal* antiepileptic mechanisms of radiations were extremely difficult - if not impossible - to investigate in rodent models of epilepsy because of the insufficient confinement of the dose provided by megavoltage clinical

devices (Brisman et al., 2003; Maesawa et al., 2000; Jenrow et al., 2004; Chen et al., 2001). By contrast, IntMRT allowed the specific irradiation of discrete brain regions and the assessment of both the functional changes within the target, and the effect of its irradiation on seizure dynamics at the brain scale. For instance, we obtained a reduction of the cumulated seizure duration only when the S1Cx was bilaterally irradiated. This effect was specific to this target and was not observed when either the MoCx or the VLTN were irradiated. This result is in agreement with the anti-absence effect of ethosuximide when injected in the S1Cx, but not in the MoCx in GAERS (Manning et al., 2004). We also observed that the irradiation of the S1Cx did not prevent the MoCx and VLTN from displaying paroxysmal oscillations. We propose that the non-irradiated thalamocortical networks were able to initiate SWDs, although with a lesser efficacy. By contrast, the bilateral thalamic irradiation left both the S1Cx and the MoCx free to oscillate in synchrony without thalamic feedback control, which would explain the increase of the number of SWDs.

Clinical potential of synchrotron X-ray microbeams

During the last two decades, radiosurgery has emerged as an attractive approach for epilepsy treatment and several clinical studies using mainly Gamma-Knife and linear accelerators reported acceptable outcomes for hypothalamic hamartomas, arteriovenous malformations and cavernomas (Romanelli & Ansel, 2006; Quigg et al., 2012). By contrast, for epilepsies arising from the mesio-temporal lobe, several reports (Régis et al., 2004; Schröttner et al., 2002; Vojtech et al., 2009) suggest that efficacy is highly dependent on the dose deposited within the target, which is intrinsically limited by the bell-shaped lateral dose gradients of the current devices. In such clinical context, the synchrotron light provides attractive physical properties in terms of precision and conformation of the dose delivery. In addition, several research groups (*i.e.* LAL in Paris or MAP in Munich) and companies (*i.e.* LynceanTech) have been recently developing compact X-ray synchrotron sources, which aim at providing a photon flux and spectrum that matches the clinical requirement for imaging and/or radiotherapy. Given that the effect of radiotherapeutic doses of X-rays on brain physiology is largely unknown, there is an important need for experimental studies that investigate the electrophysiological and histological effect of low-energy photons on laboratory animals carrying pathologies. As such, our study represents the first proof of concept in the preclinical evaluation of synchrotron MBs for the treatment of epilepsies. Several fundamental and technical problems still have to be solved before synchrotron microbeams can be considered for clinical development, including the assessment of the IntMRT effect on pharmacoresistant tissue suffering from major cell loss and/or gliosis, and the practical feasibility of irradiations on bigger animals and humans. Nevertheless, our data clearly show a clinical potential of IntMRT for epilepsy, and highlight a non-destructive antiepileptic mechanism that might be a common effect of both x-ray and gamma radiations on brain tissue.

Conclusions

Together, our results show that IntMRT was able to modify an epileptogenic cortex and disabled its ability to initiate seizures by preventing wide-scale synchronization among irradiated neuronal networks. This effect was mediated through a neuronal membrane hyperpolarization and an alteration of propagated synaptic activities, presumably caused by reduction a total cell membrane area. The present study provides a foundation to understand how x-ray radiation impacts neuronal physiology and

epileptogenic processes and opens new perspectives for synchrotron microbeam radiotherapy.

Acknowledgments

We thank H. Bernard, L. Duhamel, T. Ziegenhals and T. Brochard for their technical assistance. We are indebted to C. Deransart, I. Guillemain, S. Carnicella and A. Bravin for their valuable scientific advices and access to equipment, as well as to J. Crosbie and L. Fechter for comments on a previous version of the manuscript. **Funding:** This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Agence Nationale pour la Recherche (Grant #ANR RO6275CS "BasalEpi"), Ligue Française Contre l'Epilepsie and European Synchrotron Research Facility. **Author contributions:** B.P., R.S., F.E. and A.D designed the research. B.P., R.S., M.C., T.C., E.B.K., C.N., H.M., L.R., Y.P., S.C., J.A.L and A.D performed the research. B.P., M.C., T.C, L.R., J.A.L, S.C. and A.D analyzed the data. B.P., R.S., M.C., S.C., A.D, J.A.L and F.E. wrote the paper **Competing interests:** The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Anschel, D.J., Bravin, A. & Romanelli, P., 2010. Microbeam radiosurgery using synchrotron-generated submillimetric beams: a new tool for the treatment of brain disorders. *Neurosurgical review*, 34(2), pp.133–142.
- Bekkers, J.M. & Häusser, M., 2007. Targeted dendrotomy reveals active and passive contributions of the dendritic tree to synaptic integration and neuronal output. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), pp.11447–11452.
- Bouchet, A. et al., 2010. Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy on intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 78(5), pp.1503–1512.
- Brisman, J.L. et al., 2003. Radiosurgery of the Rat Hippocampus: Magnetic Resonance Imaging, Neurophysiological, Histological, and Behavioral Studies. *Neurosurgery*, pp.951–962.
- Chen, Z. et al., 2001. Anticonvulsant effects of gamma surgery in a model of chronic spontaneous limbic epilepsy in rats. *Journal of neurosurgery*, 94(2), pp.270–280.
- Czéh, B., Seress, L. & Czéh, G., 1999. Electrophysiological characteristics and morphological properties of dentate granule- and CA3 pyramidal cells in slices cut from neonatally irradiated rats. *Neurobiology (Budapest, Hungary)*, 7(1), pp.1–17.
- Danober, L. et al., 1998. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Progress in neurobiology*, 55(1), pp.27–57.
- Destexhe, A. & Paré, D., 1999. Impact of network activity on the integrative properties of neocortical pyramidal neurons in vivo. *Journal of neurophysiology*, 81(4), pp.1531–1547.
- Dilmanian, F.A. et al., 2006. Interlaced x-ray microplanar beams: a radiosurgery approach with clinical potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), pp.9709–9714.
- Engel, J., 1996. Surgery for seizures. *The New England journal of medicine*, 334(10), pp.647–652.
- Inaba, Y., Biagini, G. & Avoli, M., 2006. The H current blocker ZD7288 decreases epileptiform hyperexcitability in the rat neocortex by depressing synaptic transmission. *Neuropharmacology*, 51(3), pp.681–691.
- Jenrow, K. et al., 2004. Effects of kindling and irradiation on neuronal density in the rat dentate gyrus. *Neuroscience letters*, 371(1), pp.45–50.
- Kahane, P., 2004. La chirurgie de l'épilepsie chez l'adulte: pour qui? *Revue Neurologique*.

- Lopes da Silva, F., Pijn, J.P. & Boeijinga, P., 1989. Interdependence of EEG signals: linear vs. nonlinear associations and the significance of time delays and phase shifts. *Brain topography*, 2(1-2), pp.9–18.
- Maesawa, S. et al., 2000. Subnecrotic stereotactic radiosurgery controlling epilepsy produced by kainic acid injection in rats. *Journal of neurosurgery*, 93(6), pp.1033–1040.
- Manning, J.P.A. et al., 2004. Cortical-area specific block of genetically determined absence seizures by ethosuximide. *Neuroscience*, 123(1), pp.5–9.
- Mori, Y. et al., 2000. Effects of stereotactic radiosurgery on an animal model of hippocampal epilepsy. *Neurosurgery*, 46(1), pp.157–65; discussion 165–8.
- Polack, P.-O. et al., 2007. Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(24), pp.6590–6599.
- Polack, P.-O. et al., 2009. Inactivation of the somatosensory cortex prevents paroxysmal oscillations in cortical and related thalamic neurons in a genetic model of absence epilepsy. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)*, 19(9), pp.2078–2091.
- Prayson, R.A. & Yoder, B.J., 2007. Clinicopathologic findings in mesial temporal sclerosis treated with gamma knife radiotherapy. *Annals of diagnostic pathology*, 11(1), pp.22–26.
- Prezado, Y. et al., 2009. Gadolinium dose enhancement studies in microbeam radiation therapy. *Medical physics*, 36(8), pp.3568–3574.
- Quigg, M., Rolston, J. & Barbaro, N.M., 2012. Radiosurgery for epilepsy: clinical experience and potential antiepileptic mechanisms. *Epilepsia*, 53(1), pp.7–15.
- Rall, W., 1969. Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons. *Biophysical journal*, 9(12), pp.1483–1508.
- Régis, J. et al., 2004. Gamma knife surgery in mesial temporal lobe epilepsy: a prospective multicenter study. *Epilepsia*, 45(5), pp.504–515.
- Rheims, S. et al., 2011. Subcontinuous epileptiform activity after failed hippocampal radiosurgery. *Epilepsia*, 52(8), pp.1425–1429.
- Romanelli, P. & Anschel, D.J., 2006. Radiosurgery for epilepsy. *Lancet neurology*, 5(7), pp.613–620.
- Salvat, F. & Fernández-Varea, J., 2006. PENELOPE-2006: A code system for Monte Carlo simulation of electron and photon transport. *Workshop Proceedings*.
- Schröttner, O. et al., 2002. Gamma-Knife radiosurgery of mesiotemporal tumour epilepsy observations and long-term results. *Acta neurochirurgica. Supplement*, 84,

- pp.49–55.
- Serduc, R. et al., 2010. High-precision radiosurgical dose delivery by interlaced microbeam arrays of high-flux low-energy synchrotron X-rays. *PLoS ONE*, 5(2), p.e9028.
- Serduc, R. et al., 2006. In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 64(5), pp.1519–1527.
- Sims, E. et al., 1999. Stereotactically delivered cranial radiation therapy: a ten-year experience of linac-based radiosurgery in the UK. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 11(5), pp.303–320.
- Spruston, N., Stuart, G. & Häusser, M., 2007. Dendrites. In G. Stuart & N. Spruston, eds. *Dendrites*. Oxford University Press, USA, pp. 351–400.
- St George, E.J. et al., 2002. Acute symptoms after gamma knife radiosurgery. *Journal of neurosurgery*, 97(5 Suppl), pp.631–634.
- Vojtech, Z. et al., 2009. The use of radiosurgery for the treatment of mesial temporal lobe epilepsy and long-term results. *Epilepsia*, 50(9), pp.2061–2071.
- Wendling, F. et al., 2009. From EEG signals to brain connectivity: a model-based evaluation of interdependence measures. *Journal of neuroscience methods*, 183(1), pp.9–18.
- Xiang, H. et al., 2006. Reduced excitatory drive in interneurons in an animal model of cortical dysplasia. *Journal of neurophysiology*, 96(2), pp.569–578.
- Zhou, F.-W., Chen, H.-X. & Roper, S.N., 2009. Balance of inhibitory and excitatory synaptic activity is altered in fast-spiking interneurons in experimental cortical dysplasia. *Journal of neurophysiology*, 102(4), pp.2514–2525.

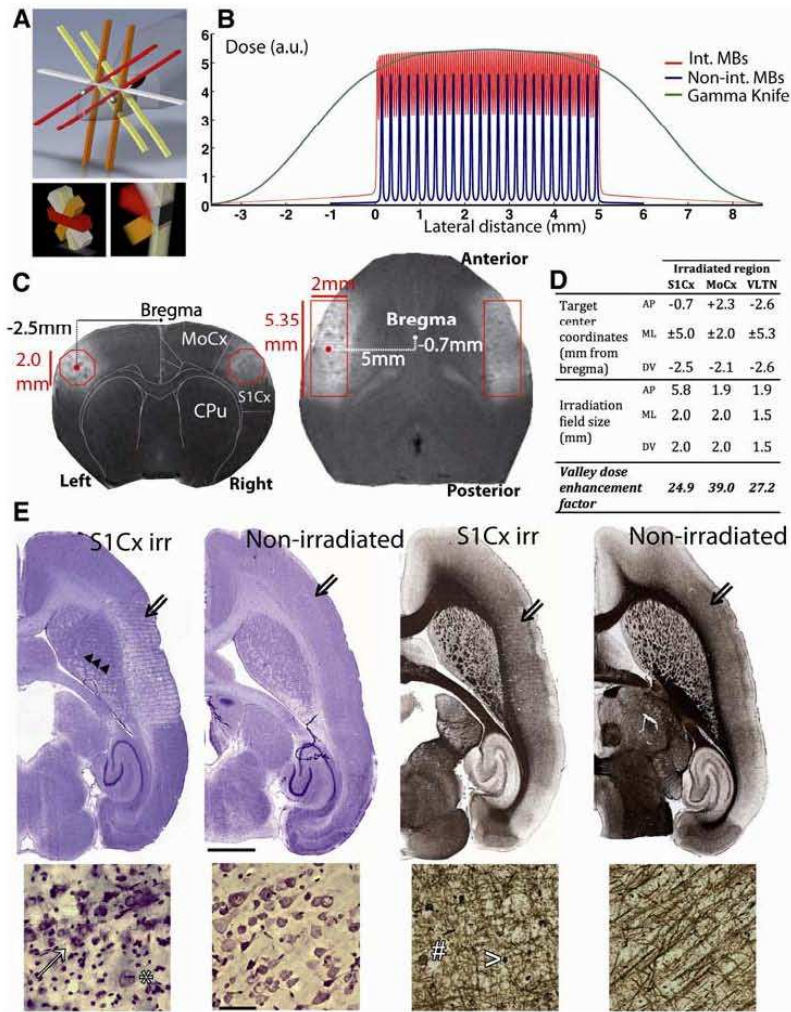


Figure 1. Irradiation geometry, magnetic resonance imaging and histopathological changes. (A) Diagram of the 4-port MB interlacement for bilateral S1Cx irradiation. The region receiving a homogenous dose is displayed in gray. (B) Lateral dose-profiles for a 5mm-wide irradiation field produced by interlaced and non-interlaced MBs and by a Leksell Perfexion® Gamma-Knife. (C) Theoretical delimitations of homogeneously irradiated volumes superimposed on horizontal and coronal T1w/GdDOTA-MR images acquired 14 days post-irradiation (200 Gy). CPu: caudate-putamen. (D) Coordinates of the three experimental targets. Valley dose enhancement factors, calculated with Monte-Carlo simulations, correspond to the valley-dose ratio between the center of the target and 1 mm away from the target. (E) Microphotographs of horizontal brain sections obtained 2 months post-irradiation compared to sections from non-irradiated brains. Sections were stained by the Nissl method (4 left panels) and for myelin sheaths (4 right panels). Lower-magnification photographs of the irradiated brain show decreases of Nissl and myelin staining densities in the S1Cx. Tracks of individual 200µm-spaced MBs outside the target are visible in the striatum (arrowheads). Double-arrows

indicate the area where high-magnification photographs were captured. Signs of neuronal damage are visible on the Nissl-stained section: rounded shapes, vacuolation (clear arrow), nuclear debris and accumulation of microglial cells around damaged neurons (*, neuronophagia). Myelin staining shows radiation-induced fragmentation of myelin sheaths, focally forming argyrophilic fragments (>) and few myelin ovoids (#). Irradiated tissue displays typical "honeycombing" figures. Scale bars: 2mm (lower-magnification images) and 100µm (high-magnification images).

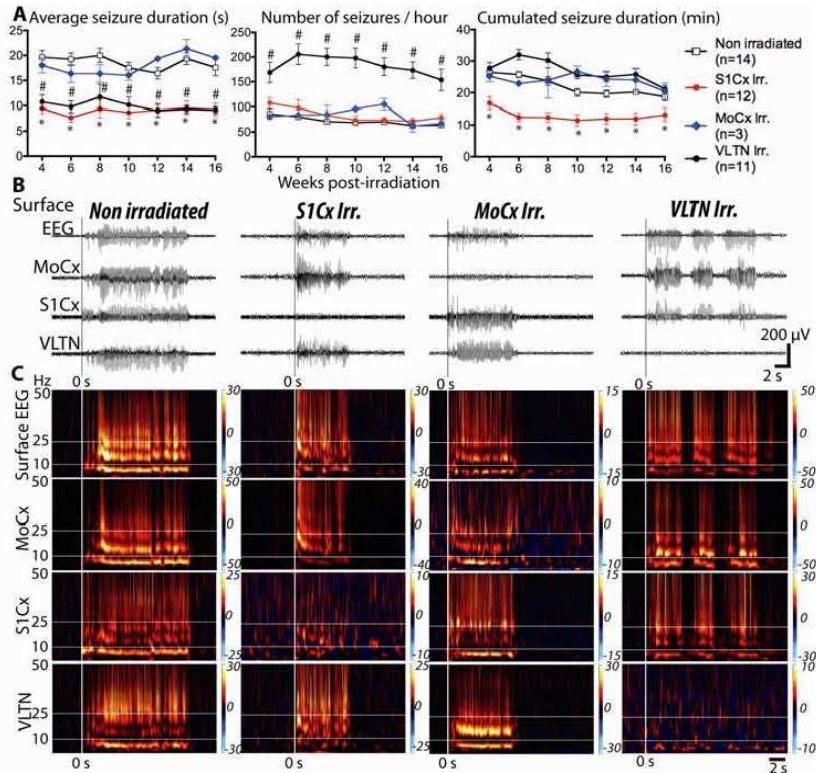


Figure 2. Spike-wave discharges after IntMRT irradiation. (A) EEG monitoring of average seizure duration, number of seizures per hour and cumulated seizure time. * and #: S1Cx- and VLTN-irradiated groups differ significantly from non-irradiated animals, respectively ($P < 0.05$). For sake of clarity, only the data obtained every two weeks are shown here. **(B)** Examples of typical seizures recorded in the non-irradiated, S1Cx-, MoCx- and VLTN-irradiated animals. Depicted signals are bipolar derivations of fronto-parietal supra-dural electrodes (Surface EEG) and of depth electrodes located in the S1Cx, MoCx and VLTN. **(C)** Normalized power of EEG and LFP signals in the time-frequency plane corresponding to the seizures displayed in (B). Baseline was the 2 s preceding seizure onset. Color code represents power-ratio between seizure and baseline.

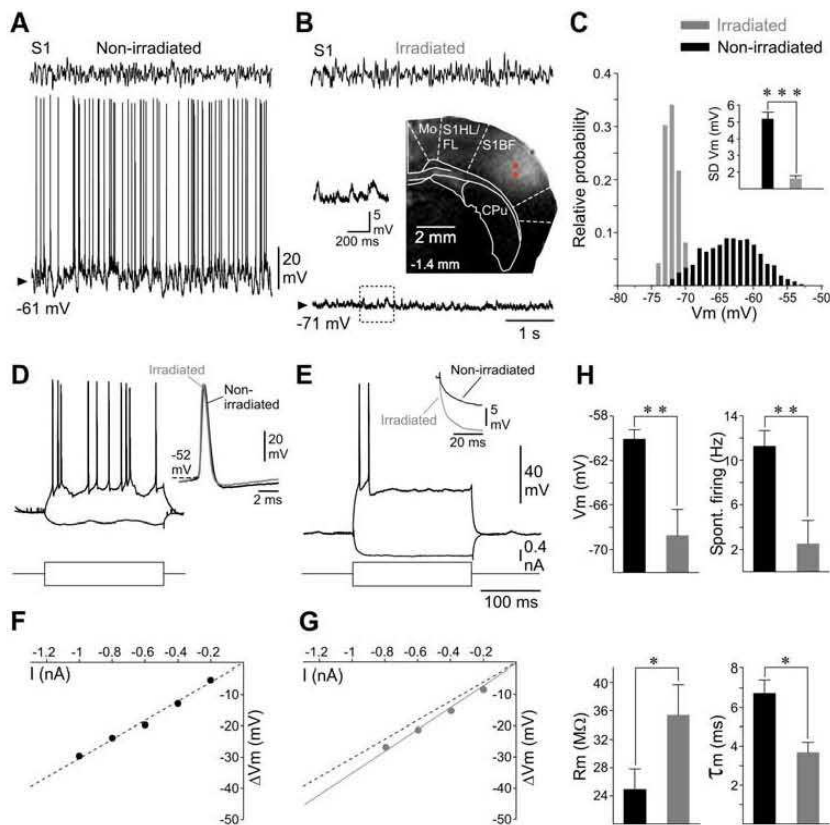


Figure 3. Interictal activity of irradiated cortical neurons. (A-B) Interictal cortical LFPs of the S1Cx and corresponding intracellular activities (bottom records) from non-irradiated (A) and S1Cx-irradiated GAERS (B). Note the membrane hyperpolarization, the attenuation of background synaptic activities and the absence of spontaneous firing in the irradiated neuron. The left *inset* in (B) is an expansion of the dashed box. The right *inset* represents the MR image of the IntMRT targeted region at -1.4mm from bregma. The lowest white point indicates the location of the irradiated cortical cell illustrated in (B) and (E). S1HL/FL: S1Cx hind-forelimb region; S1BF: barrel fields; CPu: caudate-putamen. (C) Membrane potential distributions (1 mV bin size,) calculated from 10 s subthreshold spontaneous activities in the non-irradiated and irradiated neurons shown in (A) and (B), respectively. The inset represents the standard deviation (SD) of background synaptic activities in control ($n = 19$) and irradiated ($n = 8$) neurons. (D-E) Voltage responses to ± 0.4 nA current pulses from the non-irradiated (D) and irradiated (E) neurons shown in (A) and (B), respectively. The *inset* in (E) shows the onset of voltage responses to - 0.4 nA pulses. The *inset* in (D) is the superimposition of averaged action potentials ($n = 5-10$) from the non-irradiated (A) and irradiated (B) neurons. Note the constancy of action potential amplitude, kinetics and voltage threshold (dashed line). (F-G) Mean ($n = 20$) voltage changes (ΔVm) as a function of the current intensity (I), from a non-irradiated (F) and irradiated (G) neuron. The apparent input resistance (Rm) was calculated from the $\Delta Vm-I$ curve. The dashed line in (G) is the linear fit computed in (F). (H) Values of membrane potential (Vm), spontaneous interictal firing rate, Rm and time constant (τm) in non-irradiated ($n = 19$) and irradiated ($n = 8$) neurons. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

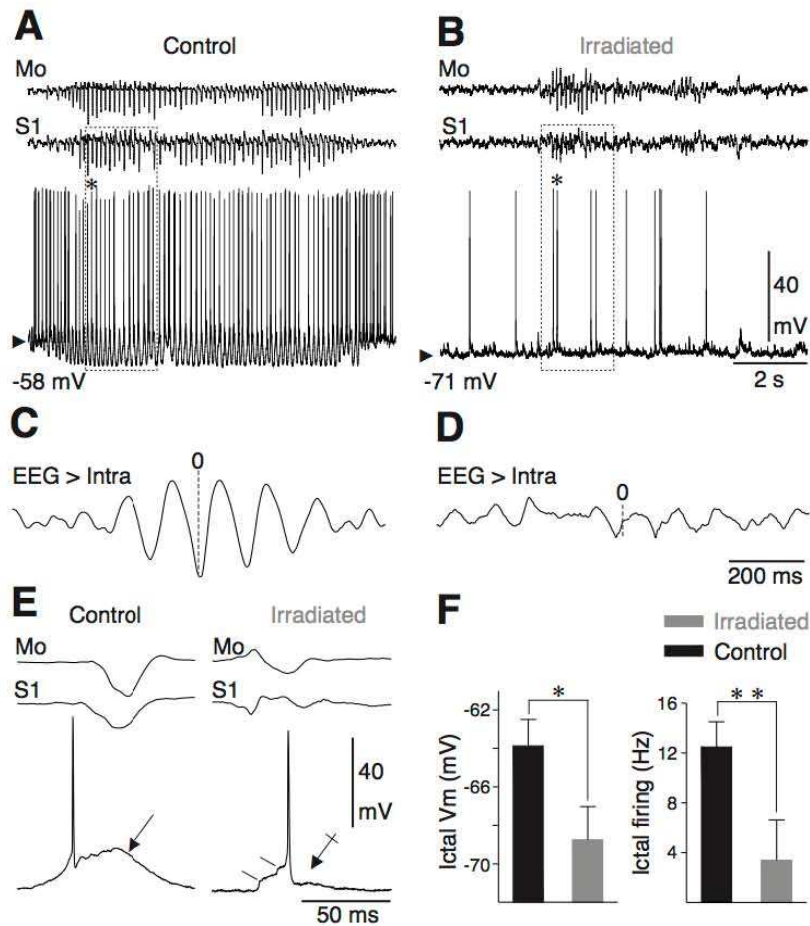


Figure 4. Intracellular activity of irradiated neurons during RPOs. (A-B) Intracellular activity (lower traces) of S1Cx neurons simultaneously recorded with the corresponding somatosensory and motor cortical LFPs during a SWD in a non-irradiated GAERS (A) and during RPO in a bilaterally-irradiated GAERS (B). The value of membrane potential is indicated at the left of the traces. (C-D) Crosscorrelograms between EEG and intracellular activities from the recording epochs, in the non-irradiated (C) and irradiated (D) GAERS. (E) Supratherreshold depolarizations (bottom records) recorded from non-irradiated and irradiated S1Cx neurons and the corresponding S1Cx and MoCx EEG paroxysms. Whereas the firing of the non-irradiated cortical neuron is generated by a smooth and prolonged, depolarization (oblique arrow), action potential discharge in the irradiated neuron is triggered by the temporal summation of discrete synaptic depolarizations (oblique lines) and followed by a lasting after-hyperpolarization (crossed arrow). (F) Values of membrane potential (Ictal Vm) and firing rate (Ictal firing), calculated during paroxysmal oscillations, in non-irradiated ($n = 19$) and irradiated ($n = 8$) S1Cx neurons. The location of the irradiated cortical cell illustrated in (B), (D) and (E) is indicated by the upper white point in Fig 4B (inset). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

1 Physiopathologie de l'épilepsie-absence

Les avancées récentes

■ Les données cliniques et expérimentales récentes, issues de modèles génétiques, montrent que les décharges pointes-ondes associées aux absences prennent naissance dans le cortex, puis sont secondairement propagées dans l'ensemble des circuits cortico-thalamiques. Les mécanismes de déclenchement et de maintien de ces paroxysmes sont en cours d'élucidation. Une avancée majeure a été la récente caractérisation d'une sous-population de neurones pyramidaux corticaux ayant des propriétés ictogéniques spécifiques, résultant d'un dysfonctionnement dans des canaux ioniques voltage-dépendants et/ou dans la "balance" entre l'excitation et l'inhibition synaptique. La récente démonstration d'une inhibition tonique des neurones thalamiques chez les animaux épileptiques appuie l'hypothèse que le thalamus n'aurait qu'un rôle dans le maintien des oscillations synchrones lors de la crise.

Mathilde Chipaux^{1,2}, et Stéphane Charpier¹

DÉFINITION

L'épilepsie-absence est un syndrome épileptique débutant dans l'enfance, caractérisé par des crises brèves (souvent inférieure à 30 secondes) et parfois très fréquentes (jusqu'à 200 par jour) (1). D'un point de vue clinique, la crise d'absence s'exprime essentiellement par un arrêt de l'activité psychomotrice volontaire et une altération des perceptions sensorielles, parfois accompagnée d'automatismes moteurs.

Ces perturbations comportementales sont associées sur l'EEG de surface à des décharges pointes-ondes (DPO) bilatérales,

synchrones et symétriques, à début et fin brusque, dont la fréquence est d'environ 3 Hz. Le seuil de réaction à des stimulations sensorielles, y compris nociceptives, est accru, mais d'intenses stimulations peuvent parfois interrompre les DPO et arrêter la crise.

ASSOCIATION THALAMUS-CORTEX DANS LE DÉCLENCHEMENT DES CRISES D'ABSENCE : HISTORIQUE

Le site de déclenchement des crises d'absence au sein du circuit cortico-thalamique a été l'objet d'intenses débats, suggérant une origine "centrencéphalique", thalamique ou néocorticale (2).

La théorie centrencéphalique,

émise en 1954 par Penfield, propose que les décharges sont issues d'un pacemaker sous-cortical, situé dans le thalamus central et le tronc cérébral, ayant des projections néocorticales diffuses.

En 1991, la théorie d'une "horloge" thalamique propose que ce pacemaker est en fait le noyau réticulé du thalamus (Fig. 1A), lequel imposerait son propre rythme aux circuits thalamo-corticaux.

Dans cette revue, nous examinons les plus récentes données cliniques et expérimentales démontrant une origine corticale aux DPO et nous décrivons les mécanismes neuronaux, synaptiques et membranaires, et de circuits pouvant sous-tendre le déclenchement et le maintien des crises.

¹ Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, UPMC/INSERM UMR-S 975; CNRS UMR 7225, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 75013, Paris
² Neurochirurgie pédiatrique, Fondation A. de Rothschild, Paris

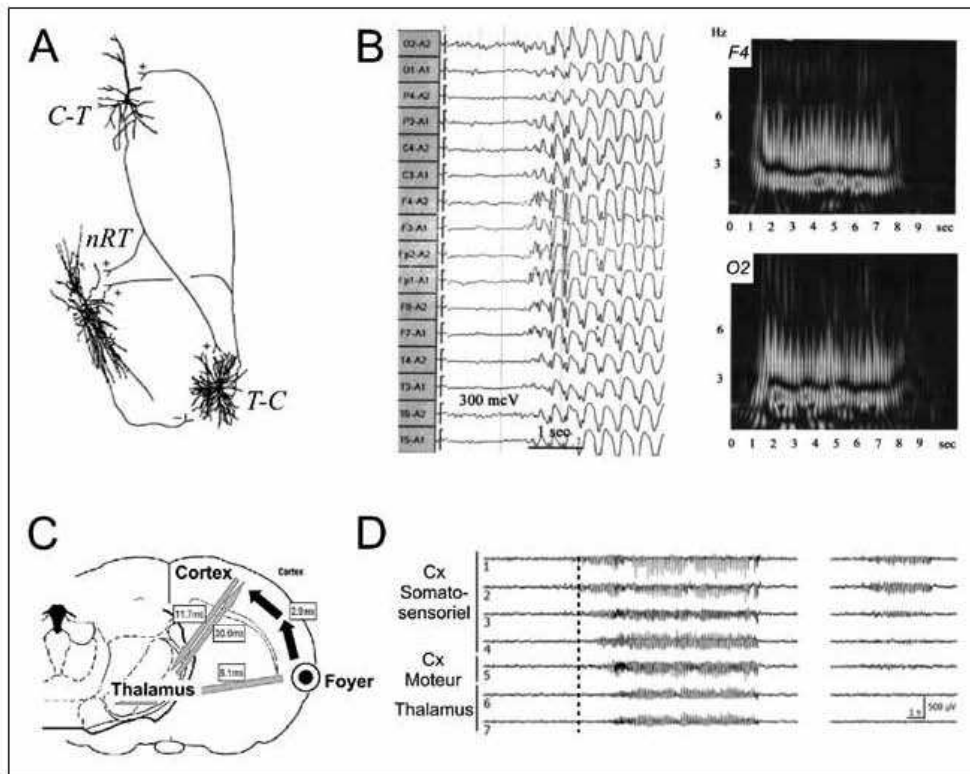


Figure 1 - Origine corticale des DPO.

A. Les DPO sont principalement présentes dans les boucles cortico-thalamo-corticales. Celles-ci sont constituées de neurones cortico-thalamiques (C-T) réciproquement connectés, par des synapses excitatrices, avec les neurones thalamo-corticaux (T-C). Ces derniers sont inhibés par les neurones du noyau réticulaire du thalamus (nRT), excités à la fois par les neurones C-T et T-C.

B. Prédominance frontale des DPO humaines. Gauche. DPO enregistrées chez une patiente de onze ans atteinte d'absence typique. Notez la présence d'oscillations précoces dans les régions frontales, suivies de DPO de grande amplitude. Les cartes temps-fréquence montrées à droite indiquent que les oscillations précoces sont exclusivement présentes dans la région frontale (F4), que les DPO prédominent dans cette région et qu'elles surviennent secondairement dans les aires occipitales (O2). Modifié d'après (3).

C. Schéma représentant les dynamiques de déclenchement (à partir d'un foyer cortical) et de propagation des DPO chez les rats WAG/Rij (rats ayant spontanément des absences). Modifié d'après (2). D. Enregistrements EEG corticaux et thalamiques chez le GAERS (autre souche de rats ayant également des absences spontanément), montrant le déclenchement des DPO dans le cortex somato-sensoriel. Les portions d'enregistrement montrées à droite illustrent la survenue isolée de DPO dans cette région ictogène. Modifié d'après (4).

CRISE GÉNÉRALISÉE OU FOCALE CORTICALE ?

Selon la classification établie par la Ligue Internationale Contre l'Epilepsie (révisée en 2010), les crises généralisées sont définies par un engagement très rapide de réseaux bilatéraux, corticaux et/ou sous-corticaux, mais n'impliquant pas nécessairement l'ensemble du manteau cortical. Les récentes données résumées

ci-dessous, concernant à la fois les modèles génétiques d'absence et les patients, convergent vers une nouvelle hypothèse physiopathologique pour l'épilepsie-absence : les DPO associées aux crises d'absence sont initialement déclenchées dans un foyer cortical, frontal ou pariétal selon les espèces, puis sont rapidement généralisées à l'ensemble des boucles cortico-thalamo-corticales (Fig. 1).

CHEZ L'ANIMAL : DONNÉES EEG ET PHARMACOLOGIQUES

L'utilisation des modèles génétiques a fourni de cruciales données électrophysiologiques et pharmacologiques en faveur de l'existence d'un "foyer" cortical à l'origine des DPO.

• Chez les rats WAG/Rij, la survenue spontanée de DPO dans l'EEG est corrélée à une immobilité de l'animal, des myoclonies

faciales et une augmentation du seuil de réactivité à des stimuli sensoriels (5). Dans ce modèle animal, l'analyse des degrés d'association statistique et des délais temporels entre les activités critiques enregistrées simultanément dans différentes régions corticales et thalamiques révèle qu'une région restreinte du cortex (somato-sensoriel) mène les activités paroxystiques dans les premiers instants de la crise (Fig. 1C) (6). Ces activités épileptiques initiées à partir d'un foyer cortical se propagent à la vitesse de 2 m/sec, vitesse compatible avec une propagation des paroxysmes via des circuits synaptiques. Lorsque la crise est pleinement généralisée, les relations d'association varient suivant les crises entre le cortex et le thalamus, les deux structures pouvant indifféremment contrôler les activités paroxystiques (6).

• Dans un autre modèle, le *Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg* (GAERS), modèle génétique le mieux décrit et présentant les plus fortes homologues avec la maladie humaine (5), notre équipe a également identifié un foyer néocortical à l'origine des DPO. Ce foyer, localisé dans le cortex somatosensoriel primaire, présente des décharges épileptiques qui précèdent systématiquement celles du cortex moteur et des noyaux thalamiques correspondants (4, 7) (Fig. 1D). L'inactivation pharmacologique de ce foyer cortical prévient la survenue des DPO généralisées (corticales et thalamiques), alors que le blocage fonctionnel des autres aires corticales ou des noyaux thalamo-corticaux est sans effet sur la capacité endogène du foyer cortical à générer des décharges épileptiques (7). De plus, l'injec-

tion d'éthosuximide (médication anti-absence de première intention) à des doses thérapeutiques a pour effet d'arrêter les DPO et de "normaliser" les propriétés ictogéniques (voir plus bas) des neurones initiateurs des crises (8).

CHEZ L'ANIMAL : IDENTIFICATION DES NEURONES "ICTOGÉNIQUES"

Des enregistrements intracellulaires *in vivo* réalisés chez le GAERS ont permis d'identifier une sous-population de neurones corticaux à l'origine des événements paroxystiques. Ces neurones "initiateurs" des crises sont des cellules pyramidales excitatrices (glutamatergiques) localisées dans les couches profondes (V et VI) du foyer (4, 7) (Fig. 2A). Ils sont plus dépolarisés et plus actifs durant les périodes critiques et inter-critiques, comparés aux autres neurones corticaux et thalamiques. Lors des pointes EEG, ces neurones ictogéniques émettent des bouffées de potentiels d'action à haute fréquence (Fig. 2B, C), lesquelles précèdent la décharge, souvent modérée, des autres neurones corticaux et des cellules thalamo-corticales correspondantes (Fig. 2C).

L'hyperactivité des neurones des couches profondes du foyer cortical pourrait provenir d'une augmentation de la transmission glutamatergique (de type NMDA), combinée à une réduction de l'activité GABAergique de type A (9), ce qui pourrait également rendre compte de leur potentiel de membrane plus dépolarisé. Cependant, de récents résultats obtenus dans notre laboratoire indiquent que la décharge des neurones ictogéniques est négativement contrôlée par les interneurons locaux (Fig. 2E), démontrant ainsi la fonctionnalité du système GABAer-

gique au sein du foyer cortical, et suggérant un effet inhibiteur sur les neurones ictogéniques. Il est également proposé que l'hyperactivité de ces neurones soit due à une modification d'excitabilité intrinsèque résultant d'une expression accrue de canaux sodiques voltage-dépendants (10) et/ou d'une réduction d'un courant cationique activé lors de l'hyperpolarisation (11).

De manière cohérente avec leur propriété d'initiation des crises, les neurones des couches profondes du foyer présentent spontanément des oscillations membranaires (Fig. 2D) non signalées dans l'EEG de surface pouvant, par un effet de recrutement local progressif, embraser les circuits neuronaux du foyer (4). La compréhension des mécanismes cellulaires sous-tendant ces oscillations "anticipatrices" des crises permettrait de préciser les processus dynamiques de genèse et de généralisation des DPO à partir du foyer. L'ensemble de ces données fournissent une base cellulaire pour l'hypothèse électro-clinique, émergente depuis peu, que les crises d'absence ne seraient pas au sens « classique » strictement généralisées mais « focales néocorticales », se généralisant rapidement (10-15 ms chez le rat, 40 ms chez l'homme) aux deux hémisphères.

DONNÉES HUMAINES : IMPLICATION DU LOBE FRONTAL

Des récentes investigations EEG en "haute résolution" chez de jeunes patients atteints d'épilepsie-absence démontrent une implication du lobe frontal dans les processus dynamiques de genèse des DPO (3) (Fig. 1B). Par ailleurs, deux études en magnétoencéphalographie décrivent une origine frontale

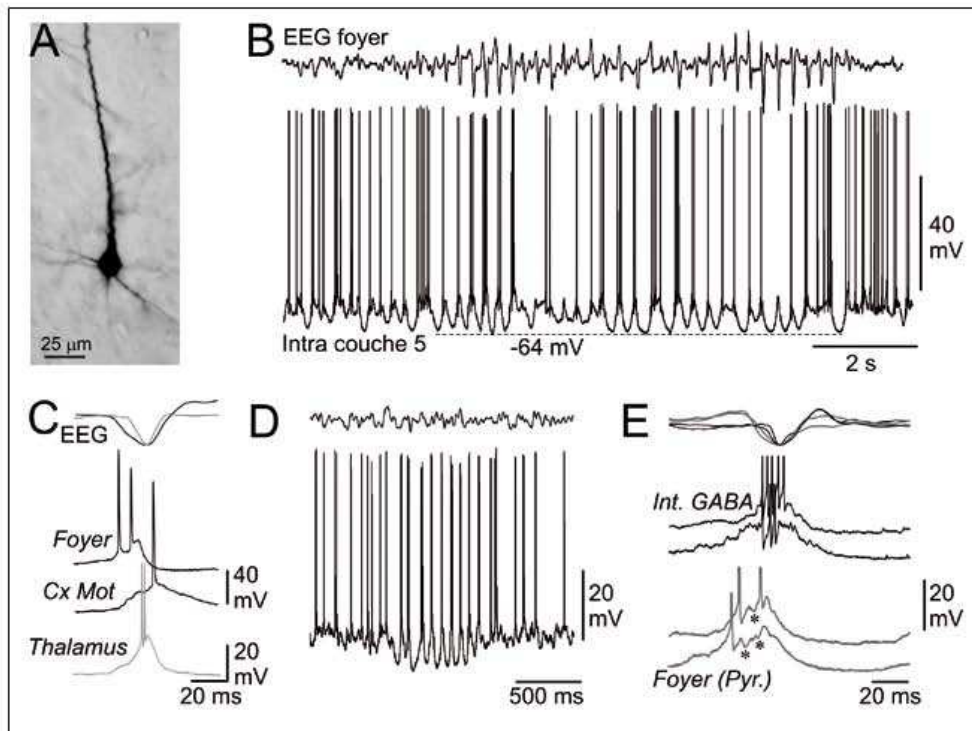


Figure 2 - Propriétés morpho-fonctionnelles des neurones ictogéniques du GAERS.

A. Microphotographie d'un neurone pyramidal, initiateur des crises, localisé dans les couches profondes du cortex somato-sensoriel du GAERS.

B. Enregistrements simultanés des activités EEG (EEG foyer) et intracellulaires d'un neurone ictogénique du foyer cortical (intra couche 5) lors d'une DPO.

C. Alignement temporel (en fonction des pointes EEG du foyer, traces du haut) des activités intracellulaires d'un neurone ictogénique du foyer, d'un neurone du cortex moteur (Cx Mot) et d'un neurone thalamo-cortical (thalamus).

D. Les neurones du foyer peuvent présenter des oscillations intracellulaires (trace du bas) isolées et non représentées dans l'EEG de surface correspondant (trace du haut).

E. Enregistrements intracellulaires d'un interneurone GABAergique (int. GABA) et d'un neurone pyramidal du foyer, alignés avec les pointes EEG correspondantes (traces du haut). La décharge des interneurons est corrélée avec des potentiels synaptiques inhibiteurs (astérisques) qui interrompent la décharge dans les neurones pyramidaux (résultats non publiés). Les potentiels d'action ont été tronqués.

A et D, modifiés d'après (4).

centrale des décharges (12) ou de fortes associations entre les cortex frontaux droit et gauche au moment de l'apparition des DPO, suivies d'une activation frontale latérale et pariétale mésiale au cours de la décharge (13).

En période pré-critique, une étude en spectroscopie proche de l'infrarouge (*Near-infrared spectroscopy*: NIRS) a mis en évidence une augmentation de l'oxygénation frontale dans les 10 secondes précédant les crises

(14).

Enfin, les données en IRM fonctionnelle montrent, soit une diminution du métabolisme en frontal et en temporopariétal (15-17) concomitante aux décharges, soit une activation frontale orbitale/médiale et pariétale, débutant plusieurs secondes avant le début des crises (18, 19). Dans tous les cas, l'activation frontale précède l'activation thalamique, avec une topographie spécifique pour chaque patient (18).

PARTICIPATION DES NOYAUX THALAMIQUES : MAINTIEN DES OSCILLATIONS PAROXYSTIQUES

Aucune donnée électro-clinique ou d'imagerie métabolique cérébrale ne démontre un déclenchement initial des DPO au sein des noyaux thalamiques.

Ceci est corroboré par les nombreuses expériences électrophysiologiques et pharmacologiques réalisées dans divers modèles animaux de l'épilepsie-absence.

Chez le GAERS, les neurones thalamo-corticaux, notamment ceux se projetant vers le foyer cortical, ont un taux de décharge, durant les périodes critiques et inter-critiques, très inférieur à celui des neurones cortico-thalamiques correspondants (7). De plus, les potentiels d'action émis par ces neurones thalamiques lors de crises sont systématiquement "retardés" (≈ 9 ms) par rapport à ceux des neurones ictogéniques du foyer cortical (Fig. 2C) (7). Ce résultat est concordant avec l'analyse temporelle du flux d'information entre le foyer cortical et les noyaux thalamiques correspondants chez le GAERS démontrant une propagation unidirectionnelle, du cortex vers le thalamus, au moins durant la première seconde de la crise (7). De manière cohérente, une interruption de l'activité électrique dans le foyer cortical supprime les oscillations dans les neurones thalamiques alors que leur propre inactivation est sans effet sur les capacités endogènes du foyer à générer des DPO (7). Ce rôle "secondaire" des projections thalamo-corticales dans l'expression DPO a été également démontré dans un modèle pharmacologique félin dans lequel les neurones thalamiques sont fortement hyperpolarisés lors des paroxysmes corticaux et génèrent peu de potentiel d'action (20). La relative inhibition des neurones thalamo-corticaux lors des crises est vraisemblablement sous-tendue par des phénomènes synergiques, de réseaux et moléculaires, amplifiant l'inhibition synaptique dans les noyaux thalamiques de relais. Les neurones du noyau réticulaire du thalamus, principale source d'inhibition GABAergique des neurones thalamo-corticaux (Fig. 1A), présentent lors des DPO des décharges rythmiques, et en bouffées, de

potentiels d'action (21), résultant probablement d'une sur-activation des canaux calciques de type T (22). Cette hyperactivité des afférences GABAergiques produirait un accroissement de l'inhibition "tonique" de type GABA-A dans les neurones thalamiques, laquelle serait de surcroît accrue par un dysfonctionnement dans la recapture synaptique de GABA (23).

Ainsi, la relativement faible activité des neurones thalamo-corticaux lors des crises, mais néanmoins périodique et synchronisée, participerait, via des excitations rythmiques glutamatergiques des neurones cortico-thalamiques, à l'"entraînement" et au maintien des oscillations paroxystiques cortico-thalamo-corticales lors des DPO.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'épilepsie-absence est une épilepsie d'origine génétique multifactorielle, qui engage vraisemblablement des déficits fonctionnels dans le cortex et le thalamus, lesquels sont responsables de la genèse et du maintien d'oscillations synchrones anormales entre ces deux structures.

Les données cliniques et fondamentales les plus récentes convergent vers une nouvelle hypothèse physiopathologique dans laquelle les circuits et leurs neurones corticaux constituent le "déclencheur" de la crise alors que les neurones thalamo-corticaux n'auraient pour fonction que de favoriser et de maintenir les processus rythmiques dans la boucle cortico-thalamo-corticale.

Au sein de la région corticale initiatrice, considérée maintenant comme un véritable foyer épileptogénique, l'hyperactivité

neuronale résulterait d'une synergie pathologique associant un accroissement d'excitabilité intrinsèque et un déséquilibre entre la transmission glutamatergique et GABAergique, cette dernière restant néanmoins fonctionnelle et inhibitrice, contrairement à d'autres formes d'épilepsie (24).

La récente démonstration d'une sur-inhibition GABAergique des neurones thalamiques, cohérente avec le faible taux de décharge de ces neurones lors des crises, réfute la possibilité d'une origine thalamique des DPO et renforce l'hypothèse que le thalamus participe essentiellement au maintien de la cohérence temporelle dans les oscillations cortico-sous-corticales.

Les processus dynamiques initiant les DPO au sein même du foyer ictogénique restent inconnus. Cependant, les oscillations, isolées ou synchrones, survenant dans le foyer au cours des périodes inter-critiques et pré-critiques constituent une piste prometteuse pour établir un schéma mécanistique complet des processus de déclenchement des absences. ■

Correspondance

Dr Mathilde Chipaux
Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière
UPMC/INSERM
UMR-S 975; CNRS UMR 7225
Hôpital Pitié-Salpêtrière
75013, Paris
E-mail : mathilde.chipaux@etu.upmc.fr

Mots-clés :

Epilepsie-absence, Physiopathologie, Foyer cortical, Décharge pointe-onde, EEG, Excitabilité, Ictogénèse, Cortex, Thalamus, GABA, EEG, Enfant, Modèles animaux

BIBLIOGRAPHIE

1. Hirsch E, Panayiotopoulos CP. Epilepsie-absences de l'enfance et syndromes apparentés. In: Roger J, Bureau M, Dravet Ch, Genton P, Tassinari CA, Wolf P, eds. Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent (4th edn). Londres: John Libbey, 2005; 315-36.
2. Meeren H, van Luijckelaar G, Lopes da Silva F et al. Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol* 2005; 62: 371-6.
3. Bosnyakova D, Gabova A, Zharikova A et al. Some peculiarities of time-frequency dynamics of spike-wave discharges in humans and rats. *Clin Neurophysiol* 2007; 118: 1736-43.
4. Polack PO, Guillemain I, Hu E et al. Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci* 2007; 27: 6590-9.
5. Depaulis A, Van Luijckelaar EL. In: Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL, eds. Models of seizures and epilepsy, eds. London: Elsevier Academic press, 2005: 233-48.
6. Meeren HK, Pijn JP, van Luijckelaar EL et al. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* 2002; 22: 1480-95.
7. Polack PO, Mahon S, Chavez M et al. Inactivation of the somatosensory cortex prevents paroxysmal oscillations in cortical and related thalamic neurons in a genetic model of absence epilepsy. *Cereb Cortex* 2009; 19: 2078-91.
8. Polack PO, Charpier S. Ethosuximide converts ictogenic neurons initiating absence seizures into normal neurons in a genetic model. *Epilepsia* 2009; 50: 1816-20.
9. D'Antuono M, Inaba Y, Biagini G et al. Synaptic hyperexcitability of deep layer neocortical cells in a genetic model of absence seizures. *Genes Brain Behav* 2006; 5: 73-84.
10. Klein JP, Khara DS, Nersisyan H et al. Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy. *Brain Res* 2004; 1000 (1-2): 102-9.
11. Strauss U, Kole MH, Bräuer AJ et al. An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 3048-58.
12. Le Van Quyen M, Amor F, Rudrauf D. Exploring the dynamics of collective synchronizations in large ensembles of brain signals. *J Physiol (Paris)* 2006; 100: 194-200.
13. Westmijse I, Ossenblok P, Gunning B et al. Onset and propagation of spike and slow wave discharges in human absence epilepsy: a MEG study. *Epilepsia* 2009; 50: 2538-48.
14. Roche-Labarbe N, Zaaimi B, Berquin P et al. NIRS-measured oxy- and deoxyhemoglobin changes associated with EEG spike-and-wave discharges in children. *Epilepsia* 2008; 49: 1871-80.
15. Laufs H, Lengler U, Hamandi K et al. Linking generalized spike-and-wave discharges and resting state brain activity by using EEG/fMRI in a patient with absence seizures. *Epilepsia* 2006; 47: 444-8.
16. Hamandi K, Salek-Haddadi A, Laufs H et al. EEG-fMRI of idiopathic and secondarily generalized epilepsies. *Neuroimage* 2006; 31: 1700-10.
17. Szafarski JP, DiFrancesco M, Hirschauer T et al. Cortical and subcortical contributions to absence seizure onset examined with EEG/fMRI. *Epilepsy Behav* 2010; 18: 404-13.
18. Moeller F, LeVan P, Mühle H et al. Absence seizures: individual patterns revealed by EEG-fMRI. *Epilepsia* 2010; 51: 2000-10.
19. Bai X, Vestal M, Berman R et al. Dynamic time course of typical childhood absence seizures: EEG, behavior, and functional magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 2010; 30: 5884-93.
20. Timofeev I, Steriade M. Neocortical seizures: initiation, development and cessation. *Neuroscience* 2004; 123: 299-336.
21. Slaght SJ, Leresche N, Deniau JM et al. Activity of thalamic reticular neurons during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. *J Neurosci* 2002; 22: 2323-34.
22. Tsakiridou E, Bertolini L, de Curtis M et al. Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J Neurosci* 1995; 15: 3110-7.
23. Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ et al. Enhanced tonic GABA_A inhibition in typical absence epilepsy. *Nat Med* 2009; 15: 1392-8.
24. Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S et al. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 2007; 27: 9866-73.

Pour en savoir plus

- Betting LE, Mory SB, Lopes-Cendes I et al. MRI volumetry shows increased anterior thalamic volumes in patients with absence seizures. *Epilepsy Behav* 2006; 8: 575-80.
- Blumenfeld H. Consciousness and epilepsy: why are patients with absence seizures absent? *Prog Brain Res* 2005; 150: 271-86.
- Caplan R, Siddarth P, Gurbani S et al. Depression and anxiety disorders in pediatric epilepsy. *Epilepsia* 2005; 46: 720-30.
- Caplan R, Siddarth P, Stahl I et al. Childhood absence epilepsy: behavioral, cognitive, and linguistic comorbidities. *Epilepsia* 2008; 49: 1838-46.
- Clemens B, Bessenyei M, Piro P et al. Characteristic distribution of interictal brain electrical activity in idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48: 941-9.
- Craiu D, Magureanu S, van Emde Boas W. Are absences truly generalized seizures or partial seizures originating from or predominantly involving the pre-motor areas? Some clinical and theoretical observations and their implications for seizure classification. *Epilepsy Res* 2006; 70 (Suppl 1): S141-55.
- Crunelli V, Leresche N. Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 371-82.
- Fojtiková D, Brázdil M, Horký J et al. Magnetic resonance spectroscopy of the thalamus in patients with typical absence epilepsy. *Seizure* 2006; 15: 533-40.
- Gholipour T, Moeller F, Pittau F et al. Reproducibility of interictal EEG-fMRI results in patients with epilepsy. *Epilepsia* 2010 Nov 3, doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02768.x. Epub ahead of print.
- Hamandi K, Salek-Haddadi A, Laufs H et al. EEG-fMRI of idiopathic and secondarily generalized epilepsies. *Neuroimage* 2006; 31: 1700-10.
- Holmes MD, Brown M, Tucker DM. Are "generalized" seizures truly generalized? Evidence of localized mesial frontal and frontopolar discharges in absence. *Epilepsia* 2004; 45: 1568-79.
- Hughes SW, Crunelli V. Thalamic mechanisms of EEG alpha rhythms and their pathological implications. *Neuroscientist* 2005; 11: 357-72.
- Hughes JR. Absence seizures: a review of recent reports with new concepts. *Epilepsy Behav* 2009; 15: 404-12.
- Joci-Jakubi B, Jovanovi M, Jankovi DS et al. Frontal-onset absences in children: associated with worse outcome? A replication study. *Seizure* 2009; 18: 275-8.
- Jones NC, Salzberg MR, Kumar G et al. Elevated anxiety and depressive-like behavior in a rat model of genetic generalized epilepsy suggesting common causation. *Exp Neurol* 2008; 209: 254-60.
- Labate A, Briellmann RS, Abbott DF et al. Typical childhood absence seizures are associated with thalamic activation. *Epileptic Disord* 2005; 7: 373-7.
- Lagae L, Pauwels J, Monté CP et al. Frontal absences in children. *Eur J Paediatr Neurol* 2001; 5: 243-51.
- Moeller F, Siebner HR, Wolff S et al. Simultaneous EEG-fMRI in drug-naïve children with newly diagnosed absence epilepsy. *Epilepsia* 2008; 49: 1510-9.
- Stefan H, Rappaport S. Current clinical-neurophysiological findings in absence epilepsies. *Nervenarzt* 2009; 80: 378-85.
- Tucker DM, Brown M, Luu P et al. Discharges in ventromedial frontal cortex during absence spells. *Epilepsy Behav* 2007; 11: 546-57.
- Salek-Haddadi A, Lemieux L, Merschhemke M et al. Functional magnetic resonance imaging of human absence seizures. *Ann Neurol* 2003; 53: 663-7.
- Sirén A, Kylläinen A, Tenhunen M et al. Beneficial effects of antiepileptic medication on absence seizures and cognitive functioning in children. *Epilepsy Behav* 2007; 11: 85-91.
- Ureña-Hornos T, Rubio-Rubio R, Gros-Esteban D et al. Absence epilepsy. A review of our 14 years' experience. *Rev Neurol* 2004; 39: 1113-9.

- Adie W. 1924. Pyknolepsy: A Form of Epilepsy occurring in Children, with a Good Prognosis *Brain* 47:96-101
- Alloway K. 2008. Information processing streams in rodent barrel cortex: the differential functions of barrel and septal circuits. *Cereb Cortex* 18:979-89
- Amitai Y, Connors BW. 1994. The barrel cortex of rodents. In *Cerebral Cortex.* , ed. Je Diamond. New York.: Plenum Press
- Amzica F, Steriade M. 2000a. Integration of low-frequency sleep oscillations in corticothalamic networks. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60:229-45
- Amzica F, Steriade M. 2000b. Neuronal and glial membrane potentials during sleep and paroxysmal oscillations in the neocortex. *J Neurosci* 20:6648-65
- Arthuis M, Valton L, Regis J, Chauvel P, Wendling F, et al. 2009. Impaired consciousness during temporal lobe seizures is related to increased long-distance cortical-subcortical synchronization. *Brain* 132:2091-101
- Asano E, Chugani DC, Juhasz C, Muzik O, Chugani HT. 2001. Surgical treatment of West syndrome. *Brain Dev* 23:668-76
- Asano E, Juhasz C, Shah A, Muzik O, Chugani DC, et al. 2005. Origin and propagation of epileptic spasms delineated on electrocorticography. *Epilepsia* 46:1086-97
- Audic-Gerard F, Szepetowski P, Genton P. 2003. [GEFS + syndrome: phenotypic variations from the newborn to the adult in a large French pedigree]. *Rev Neurol (Paris)* 159:189-95
- Avoli M, Gloor P, Kostopoulos G, Gotman J. 1983. An analysis of penicillin-induced generalized spike and wave discharges using simultaneous recordings of cortical and thalamic single neurons. *J Neurophysiol* 50:819-37
- Bai X, Vestal M, Berman R, Negishi M, Spann M, et al. 2010. Dynamic time course of typical childhood absence seizures: EEG, behavior, and functional magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 30:5884-93
- Bal T, von Krosigk, M. et McCormick, D. A. 1995. Role of the ferret perigeniculate nucleus in the generation of synchronized oscillations in vitro. *J Physiol* 483:665-85
- Bancaud J, Talairach J, Bonis A, Schaub C, Szikla G, et al. 1965. *La stereo-électroencéphalographie dans l'épilepsie*. Paris: Masson

- Bancaud J, Talairach J, Bonis A, Schaub C, Szikla G, Morel P, Bordas-Ferrier M. 1965. *La stereo-électroencéphalographie dans l'épilepsie*. paris: Masson
- Beaumanoir A., Blume, W. 2005. Le syndrome de Lennox-Gastaut. In *Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent* ed. BM Roger J, Dravet Ch, Genton P, Tassinari CA, Wolf P pp. 125-48 Londres: John Libbey
- Bennett F. 1953. Intracarotid and intrevertebral metrazol in petit mal epilepsy. *Neurology* 3:668-73
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, et al. 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51:676-85
- Berg AT, Shinnar S, Levy SR, Testa FM, Smith-Rapaport S, Beckerman B. 2000. How well can epilepsy syndromes be identified at diagnosis? A reassessment 2 years after initial diagnosis. *Epilepsia* 41:1269-75
- Berman R, Negishi M, Vestal M, Spann M, Chung MH, et al. 2010. Simultaneous EEG, fMRI, and behavior in typical childhood absence seizures. *Epilepsia* 51:2011-22
- Betting LE, Mory SB, Lopes-Cendes I, Li LM, Guerreiro MM, et al. 2006a. MRI reveals structural abnormalities in patients with idiopathic generalized epilepsy. *Neurology* 67:848-52
- Betting LE, Mory SB, Lopes-Cendes I, Li LM, Guerreiro MM, et al. 2006b. MRI volumetry shows increased anterior thalamic volumes in patients with absence seizures. *Epilepsy Behav* 8:575-80
- Beydoun A, D'Souza J. 2012. Treatment of idiopathic generalized epilepsy - a review of the evidence. *Expert Opin Pharmacother* 13:1283-98
- Blumenfeld H. 2005. Consciousness and epilepsy: why are patients with absence seizures absent? *Prog Brain Res* 150:271-86
- Blumenfeld H. 2012. Impaired consciousness in epilepsy. *Lancet Neurol* 11:814-26
- Blumenfeld H, Varghese GI, Purcaro MJ, Motelow JE, Enev M, et al. 2009. Cortical and subcortical networks in human secondarily generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 132:999-1012

- Blumenfeld H, Westerveld M, Ostroff RB, Vanderhill SD, Freeman J, et al. 2003. Selective frontal, parietal, and temporal networks in generalized seizures. *Neuroimage* 19:1556-66
- Bosnyakova D, Gabova A, Zharikova A, Gnezditski V, Kuznetsova G, van Luijtelaar G. 2007. Some peculiarities of time-frequency dynamics of spike-wave discharges in humans and rats. *Clin Neurophysiol* 118:1736-43
- Bruno MA VA, Thibaut A, Moonen G, Laureys S. 2011. From unresponsive wakefulness to minimally conscious PLUS and functional locked-in syndromes: recent advances in our understanding of disorders of consciousness. . *J Neurol.* 258:1373-84
- Bruno RM, Sakmann B. 2006. Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science* 312:1622-7
- Buchel C, Josephs O, Rees G, Turner R, Frith CD, Friston KJ. 1998. The functional anatomy of attention to visual motion. A functional MRI study. *Brain* 121 (Pt 7):1281-94
- Bulteau C. 2011. Retentissement neuropsychologique des épilepsies-absences: Les troubles neuropsychologiques et comportementaux. *Neurologies* 14:244-47
- Bureau I, von Saint Paul F, Svoboda K. 2006. Interdigitated paralemniscal and lemniscal pathways in the mouse barrel cortex. *PLoS Biol* 4:e382
- Bureau M, Tassinari CA. 2005. Le syndrome des absences myocloniques. In *Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent* ed. BM Roger J, Dravet Ch, Genton P, Tassinari CA, Wolf P pp. 337-46 Londres: John Libbey
- Burgess DL. 2006. Transgenic and gene replacement models of epilepsy: targeting ion channel and neurotransmission pathways in mice. In *Models of seizures and epilepsy*, ed. A Pitkänen, PA Schwartzkroin, SL Moshé, pp. 199-222. Oxford: Elsevier
- Buzsaki G. 1991. The thalamic clock: emergent network properties. *Neuroscience* 41:351-64
- Callenbach PM, Geerts AT, Arts WF, van Donselaar CA, Peters AC, et al. 1998. Familial occurrence of epilepsy in children with newly diagnosed multiple seizures: Dutch Study of Epilepsy in Childhood. *Epilepsia* 39:331-6

- Cancedda L, Fiumelli H, Chen K, Poo MM., . 2007. Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J Neurosci.* 27:5224-35
- Caplan R, Sagun J, Siddarth P, Gurbani S, Koh S, et al. 2005. Social competence in pediatric epilepsy: insights into underlying mechanisms. *Epilepsy Behav* 6:218-28
- Caplan R, Siddarth P, Stahl L, Lanphier E, Vona P, et al. 2008. Childhood absence epilepsy: behavioral, cognitive, and linguistic comorbidities. *Epilepsia* 49:1838-46
- Carvell GE, Simons DJ. 1990. Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci* 10:2638-48
- Cavanna AE, Monaco F. 2009. Brain mechanisms of altered conscious states during epileptic seizures. *Nat Rev Neurol* 5:267-76
- Celikel T, Sakmann B. 2007. Sensory integration across space and in time for decision making in the somatosensory system of rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1395-400
- Cesaro P, Keravel Y, Ollat H, Perschanski M, Sindou M. 1999. *Neuroanatomie Fonctionnelle - De la cellule aux comportements, vol 2 : Le cerveau, la moëlle épinière.* Paris. 404 pp.
- Chan CH, Briellmann RS, Pell GS, Scheffer IE, Abbott DF, Jackson GD. 2006. Thalamic atrophy in childhood absence epilepsy. *Epilepsia* 47:399-405
- Charpier S. 2006. Crises d'absence: Les bases de l'activité épileptique. *Neurologies* 9:550-6
- Charpier S, Leresche N, Deniau JM, Mahon S, Hughes SW, Crunelli V. 1999. On the putative contribution of GABA(B) receptors to the electrical events occurring during spontaneous spike and wave discharges. *Neuropharmacology* 38:1699-706
- Chen Y, Lu J, Pan H, Zhang Y, Wu H, et al. 2003. Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol* 54:239-43
- Chiaia NL, Rhoades RW, Bennett-Clarke CA, Fish SE, Killackey HP. 1991. Thalamic processing of vibrissal information in the rat. I. Afferent input to the medial ventral posterior and posterior nuclei. *J Comp Neurol* 314:201-16

- Chmielowska J, Carvell GE, Simons DJ. 1989. Spatial organization of thalamocortical and corticothalamic projection systems in the rat SmI barrel cortex. *J Comp Neurol* 285:325-38
- Chugani HT, Asano E, Sood S. 2010. Infantile spasms: who are the ideal surgical candidates? *Epilepsia* 51 Suppl 1:94-6
- Chung S, Li X, Nelson SB. 2002. Short-term depression at thalamocortical synapses contributes to rapid adaptation of cortical sensory responses in vivo. *Neuron* 34:437-46
- Clemens B, Bessenyei M, Piros P, Toth M, Seress L, Kondakor I. 2007. Characteristic distribution of interictal brain electrical activity in idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* 48:941-9
- Cobb S, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. 1995 Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378:75-8
- Coenen AM, Van Luijtelaar EL. 2003. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet* 33:635-55
- Contreras D. 2004. Electrophysiological classes of neocortical neurons. *Neural Netw* 17:633-46
- Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ, Orban G, Errington AC, et al. 2009. Enhanced tonic GABA_A inhibition in typical absence epilepsy. *Nat Med* 15:1392-8
- Coppola G, Auricchio G, Federico R, Carotenuto M, Pascotto A. 2004. Lamotrigine versus valproic acid as first-line monotherapy in newly diagnosed typical absence seizures: an open-label, randomized, parallel-group study. *Epilepsia* 45:1049-53
- Cox GA, Lutz CM, Yang CL, Biemesderfer D, Bronson RT, et al. 1997. Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice. *Cell* 91:139-48
- Crunelli V, Leresche N. 2002. Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat Rev Neurosci* 3:371-82
- Crunelli V, Leresche N, Cope DW. 2012. GABA-A Receptor Function in Typical Absence Seizures.
- Currier RD, Kooi KA, Saidman LJ. 1963. Prognosis of "pure" petit mal: a follow-up study *Neurology* 13:959-67

- D'Antuono M, Inaba Y, Biagini G, D'Arcangelo G, Tancredi V, Avoli M. 2006. Synaptic hyperexcitability of deep layer neocortical cells in a genetic model of absence seizures. *Genes Brain Behav* 5:73-84
- Dang-Vu TT, Bonjean M, Schabus M, Boly M, Darsaud A, et al. 2011. Interplay between spontaneous and induced brain activity during human non-rapid eye movement sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15438-43
- Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C. 1998. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol* 55:27-57
- Delgado-Escueta AV, Medina MT, Serratosa JM, Castroviejo IP, Gee MN, et al. 1999. Mapping and positional cloning of common idiopathic generalized epilepsies: juvenile myoclonus epilepsy and childhood absence epilepsy. *Adv Neurol* 79:351-74
- Dempsey E, Morison RS. 1942. The production of rhythmically recurrent cortical potentials after localized thalamic stimulation. *Am J Physiol* 135:293-300
- Depaulis A, van Luijtelaar, G. 2006. Genetic Models of Absence Epilepsy in the Rat. In *Models of Seizures and Epilepsy*, ed. SP Pitkanen A, Moshé SL, pp. 233-48. Londres: Elsevier Academic Press
- Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C, Lannes B, Warter JM. 1988. Evidence that activation of GABA receptors in the substantia nigra suppresses spontaneous spike-and-wave discharges in the rat. *Brain Res* 448:20-9
- Deransart C, Depaulis A. 2002. The control of seizures by the basal ganglia? A review of experimental data. *Epileptic Disord.* 4 61-72
- Diamond ME, von Heimendahl M, Knutsen PM, Kleinfeld D, Ahissar E. 2008. 'Where' and 'what' in the whisker sensorimotor system. *Nat Rev Neurosci* 9:601-12
- Doose H. 1992. Myoclonic-astatic epilepsy. *Epilepsy Res Suppl* 6:163-8
- Dulac O, Plouin, P, Bulteau, C. 2010. Epilepsies de l'enfant. In *Neurologie Pédiatrique* pp. 333-5. Paris: Flammarion
- Duncan CC, Mirsky AF, Lovelace CT, Theodore WH. 2009. Assessment of the attention impairment in absence epilepsy: comparison of visual and auditory P300. *Int J Psychophysiol* 73:118-22

- Dura Trave T, Yoldi Petri ME. 2006. Typical absence seizure: epidemiological and clinical characteristics and outcome. *An Pediatr (Barc)* 64:28-33
- Echenne B, Cheminal R, Roubertie A, Rivier F. 2001. Are idiopathic generalized epilepsies of childhood really benign?. *Epileptic Disord* 3 Spec No 2:SI67-72
- Feldmeyer D, Lubke J, Silver RA, Sakmann B. 2002. Synaptic connections between layer 4 spiny neurone-layer 2/3 pyramidal cell pairs in juvenile rat barrel cortex: physiology and anatomy of interlaminar signalling within a cortical column. *J Physiol* 538:803-22
- Ferri R, Iliceto G, Carlucci V. 1995. Topographic EEG mapping of 3/s spike-and-wave complexes during absence seizures. *Ital J Neurol Sci* 16:541-7
- Fischer CLJ. 2005. Evoked potentials for the prediction of vegetative state in the acute stage of coma. *Neuropsychol Rehabil.* 15:372-80
- Fojtikova D, Brazdil M, Horky J, Mikl M, Kuba R, et al. 2006. Magnetic resonance spectroscopy of the thalamus in patients with typical absence epilepsy. *Seizure* 15:533-40
- Fox K. 2008. Anatomical pathways. In *Barrel cortex*, pp. pp14-48: Cambridge University Press
- Gastaut HJ, Benoit PH, Vigouroux M, Roger A. 1954. Potentials evoked by auditory stimuli in temporal region of certain epileptics. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 6:557-64
- Gayatri NA, Livingston JH. 2006. Aggravation of epilepsy by anti-epileptic drugs. *Dev Med Child Neurol* 48:394-8
- Giguere M, Goldman-Rakic PS. 1988. Mediodorsal nucleus: areal, laminar, and tangential distribution of afferents and efferents in the frontal lobe of rhesus monkeys. *J Comp Neurol* 277:195-213
- Glauser TA, Cnaan A, Shinnar S, Hirtz DG, Dlugos D, et al. 2010. Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy. *N Engl J Med* 362:790-9
- Gloor P. 1968. Generalized cortico-reticular epilepsies. Some considerations on the pathophysiology of generalized bilaterally synchronous spike and wave discharge. *Epilepsia* 9:249-63
- Gloor P, Avoli M, Kostopoulos G. 1990. Thalamocortical relationships in generalized epilepsy with bilaterally synchronous spike-and-wave discharge. In *Generalized epilepsy: neurobiological approaches*, ed.

- Avoli M, Gloor P, Kostopoulos G, Naquet R, pp. 190-212. Boston: Birkhauser
- Goldman-Rakic P, Porrino LJ. 1985. The primate mediodorsal (MD) nucleus and its projection to the frontal lobe. *J Comp Neurol* 242:535-60
- Gotman J, Grova C, Bagshaw A, Kobayashi E, Aghakhani Y, Dubeau F. 2005. Generalized epileptic discharges show thalamocortical activation and suspension of the default state of the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15236-40
- Guillery R, SM. S. 2002. The thalamus as a monitor of motor outputs. *Phil Trans R Soc Lond* 357:1809-21
- Guillery RW, Feig SL, Lozsadi DA. 1998. Paying attention to the thalamic reticular nucleus. *Trends Neurosci* 21:28-32
- Gurbanova AA, Aker R, Berkman K, Onat FY, van Rijn CM, 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
- Guye M, Bartolomei F, Gastaut JL, Chauvel P, Dravet C. 2001. Absence epilepsy with fast rhythmic discharges during sleep: an intermediary form of generalized epilepsy? *Epilepsia* 42:351-6
- Hamandi K, Salek-Haddadi A, Laufs H, Liston A, Friston K, et al. 2006. EEG-fMRI of idiopathic and secondarily generalized epilepsies. *Neuroimage* 31:1700-10
- Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. 1993. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia* 34:453-68
- Henkin Y, Sadeh M, Kivity S, Shabtai E, Kishon-Rabin L, Gadoth N. 2005. Cognitive function in idiopathic generalized epilepsy of childhood. *Dev Med Child Neurol* 47:126-32
- Heo K, Han SD, Lim SR, Kim MA, Lee BI. 2006. Patient awareness of complex partial seizures. *Epilepsia* 47:1931-5
- Hirsch E, Panayiotopoulos C. 2005. Epilepsie-absences de l'enfance et syndromes apparentés. In *Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent*, ed. Roger J, Dravet Ch, Genton P, Tassinari CA, Wolf P, pp. 315-36. Londres: John Libbey
- Hirsch E, Panayiotopoulos, CP. 2005. Epilepsie-absences de l'enfance et syndromes apparentés. In *Les syndromes épileptiques de l'enfant et*

de l'adolescent, ed. Roger J, Dravet Ch, Genton P, Tassinari CA, Wolf P, pp. 315-36. Londres: John Libbey

- Holmes MD. 2008. Dense array EEG: methodology and new hypothesis on epilepsy syndromes. *Epilepsia* 49 Suppl 3:3-14
- Holmes MD, Brown M, Tucker DM. 2004. Are "generalized" seizures truly generalized? Evidence of localized mesial frontal and frontopolar discharges in absence. *Epilepsia* 45:1568-79
- Hubel D, Wiesel T. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* 160:106-54
- Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, et al. 2007. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 27:9866-73
- Hughes J, Stone JL, Vern BA, Weiss AC, Fino JJ, Hart LA. 1985. The relationship between visual seizures and visual evoked potentials. *Int J Neurosci* 28:297-305
- Hughes SW, Crunelli V. 2005. Thalamic mechanisms of EEG alpha rhythms and their pathological implications. *Neuroscientist* 11:357-72
- Hunter J, Jasper HH. 1949. Effects of thalamic stimulation in unanaesthetised animals; the arrest reaction and petit mal-like seizures, activation patterns and generalized convulsions. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1:305-24
- Hwang H, Kim H, Kim SH, Lim BC, Chae JH, et al. 2012. Long-term effectiveness of ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy. *Brain Dev* 34:344-8
- ILAE. 1981. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 22:489-501
- ILAE. 1989. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 30:389-99
- Jocic-Jakubi B, Jovanovic M, Jankovic DS, Lagae L. 2009. Frontal-onset absences in children: associated with worse outcome? A replication study. *Seizure* 18:275-8

- Johnson MD, Ojemann GA. 2000. The role of the human thalamus in language and memory: evidence from electrophysiological studies. *Brain Cogn* 42:218-30
- Jones E. 1998. Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience* 85:331-45
- Jones E. 2002. Thalamic circuitry and thalamo-cortical synchrony. . *Phil Trans R Soc Lond B* 357:1659-73
- Jones EG. 1975. Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 160:205-67
- Jones NC, Martin S, Megatia I, Hakami T, Salzberg MR, et al. 2010. A genetic epilepsy rat model displays endophenotypes of psychosis. *Neurobiol Dis* 39:116-25
- Jones NC, Salzberg MR, Kumar G, Couper A, Morris MJ, O'Brien TJ. 2008. Elevated anxiety and depressive-like behavior in a rat model of genetic generalized epilepsy suggesting common causation. *Exp Neurol* 209:254-60
- Jouveneau A, Eunson LH, Spauschus A, Ramesh V, Zuberi SM, et al. 2001. Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet* 358:801-7
- Jung R. 1939. Uber vegetative Reaktionen und Hemmungswirkung von Sinnesreizen im kleinen epileptischen Anfall. *Nervenarzt*. 12:169-85
- Kaminska A, Ickowicz A, Plouin P, Bru MF, Dellatolas G, Dulac O. 1999. Delineation of cryptogenic Lennox-Gastaut syndrome and myoclonic astatic epilepsy using multiple correspondence analysis. *Epilepsy Res* 36:15-29
- Kawaguchi Y. 1995. Physiological Subgroups of Nonpyramidal Cells with Specific Morphological Characteristics in Layer II/III of Rat Frontal Cortex. *J Neurosci* 15:2638-55
- Keller A. 1995. Synaptic organisation of the barrel cortex. In *The barrel cortex of rodents*, ed. Jones EG, Diamond IT, pp. 221-62. New York: Plenum Press
- Keller A, Carlson GC. 1999. Neonatal whisker clipping alters intracortical, but not thalamocortical projections, in rat barrel cortex. *J Comp Neurol* 412:83-94

- Kelley S, Kossoff EH. 2010. Doose syndrome (myoclonic-astatic epilepsy): 40 years of progress. *Dev Med Child Neurol* 52:988-93
- Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL. 2004. Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 19:590-600
- Khazipov R, Luhmann HJ. 2006. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci*. 29:414-8.
- Killory BD, Bai X, Negishi M, Vega C, Spann MN, et al. 2011. Impaired attention and network connectivity in childhood absence epilepsy. *Neuroimage* 56:2209-17
- Klein JP, Khera DS, Nersesyan H, Kimchi EY, Waxman SG, Blumenfeld H. 2004. Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy. *Brain Res* 1000:102-9
- Kobayashi K, Nishibayashi N, Ohtsuka Y, Oka E, Ohtahara S. 1994. Epilepsy with electrical status epilepticus during slow sleep and secondary bilateral synchrony. *Epilepsia* 35:1097-103
- Koralek KA, Jensen KF, Killackey HP. 1988. Evidence for two complementary patterns of thalamic input to the rat somatosensory cortex. *Brain Res* 463:346-51
- Kostopoulos GK. 2001. Involvement of the thalamocortical system in epileptic loss of consciousness. *Epilepsia* 42 Suppl 3:13-9
- Labate A, Briellmann RS, Abbott DF, Waites AB, Jackson GD. 2005. Typical childhood absence seizures are associated with thalamic activation. *Epileptic Disord* 7:373-7
- Lagae L, Pauwels J, Monte CP, Verhelle B, Vervisch I. 2001. Frontal absences in children. *Eur J Paediatr Neurol* 5:243-51
- Laufs H, Lengler U, Hamandi K, Kleinschmidt A, Krakow K. 2006. Linking generalized spike-and-wave discharges and resting state brain activity by using EEG/fMRI in a patient with absence seizures. *Epilepsia* 47:444-8
- Le Van Quyen M, Amor F, Rudrauf D. 2006. Exploring the dynamics of collective synchronizations in large ensembles of brain signals. *J Physiol Paris* 100:194-200
- Leary L, Wang D, Nordli DR Jr, Engelstad K, De Vivo DC. 2003. Seizure characterization and electroencephalographic features in Glut-1 deficiency syndrome. *epilepsia* 44:701-7

- Lemieux JF, Blume WT. 1986. Topographical evolution of spike-wave complexes. *Brain Res* 373:275-87
- Lerche H, Weber YG, Baier H, Jurkat-Rott K, Kraus de Camargo O, et al. 2001. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: further heterogeneity in a large family. *Neurology* 57:1191-8
- Li Q, Luo C, Yang T, Yao Z, He L, et al. 2009. EEG-fMRI study on the interictal and ictal generalized spike-wave discharges in patients with childhood absence epilepsy. *Epilepsy Res* 87:160-8
- Libet B, Alberts WW, Wright EW, Jr., Feinstein B. 1967. Responses of human somatosensory cortex to stimuli below threshold for conscious sensation. *Science* 158:1597-600
- Liu L, Zheng T, Morris MJ, Wallengren C, Clarke AL, et al. 2006. The mechanism of carbamazepine aggravation of absence seizures. *J Pharmacol Exp Ther* 319:790-8
- Liu XB, Honda CN, Jones EG. 1995. Distribution of four types of synapse on physiologically identified relay neurons in the ventral posterior thalamic nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 352:69-91
- Liu XB, Jones EG. 1999. Predominance of corticothalamic synaptic inputs to thalamic reticular nucleus neurons in the rat. *J Comp Neurol* 414:67-79
- Liu Z, Vergnes M, Depaulis A, Marescaux C. 1991. Evidence for a critical role of GABAergic transmission within the thalamus in the genesis and control of absence seizures in the rat. *Brain Res* 545:1-7
- Llinas RR, Steriade M. 2006. Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J Neurophysiol* 95:3297-308
- Loiseau J, Loiseau P, Guyot M, Duche B, Dartigues JF, Aublet B. 1990. Survey of seizure disorders in the French southwest. I. Incidence of epileptic syndromes. *Epilepsia* 31:391-6
- Loiseau P, Duche B, Pedespan JM. 1995. Absence epilepsies. *Epilepsia* 36:1182-6
- Loiseau P, Pestre M, Dartigues JF, Commenges D, Barberger-Gateau C, Cohadon S. 1983. Long-term prognosis in two forms of childhood epilepsy: typical absence seizures and epilepsy with rolandic (centrotemporal) EEG foci. *Ann Neurol* 13:642-8
- Lubke J, Feldmeyer D. 2007. Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. *Brain Struct Funct* 212:3-17

- Luo C, Li Q, Lai Y, Xia Y, Qin Y, et al. 2011. Altered functional connectivity in default mode network in absence epilepsy: a resting-state fMRI study. *Hum Brain Mapp* 32:438-49
- Lux S, Kurthen M, Helmstaedter C, Hartje W, Reuber M, Elger CE. 2002. The localizing value of ictal consciousness and its constituent functions: a video-EEG study in patients with focal epilepsy. *Brain* 125:2691-8
- Mahon S, Deniau JM, Charpier S. 2003. Various synaptic activities and firing patterns in cortico-striatal and striatal neurons in vivo. *J Physiol Paris* 97:557-66
- Marini C, Harkin LA, Wallace RH, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF. 2003. Childhood absence epilepsy and febrile seizures: a family with a GABA(A) receptor mutation. *Brain* 126:230-40
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807
- McCormick DA, Contreras D. 2001. On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu Rev Physiol* 63:815-46
- Meeren H, van Luijtelaar G, Lopes da Silva F, Coenen A. 2005. Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol* 62:371-6
- Meeren HK, Pijn JP, Van Luijtelaar EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH. 2002. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* 22:1480-95
- Meyer HS, Wimmer VC, Oberlaender M, de Kock CP, Sakmann B, Helmstaedter M. 2010. Number and laminar distribution of neurons in a thalamocortical projection column of rat vibrissal cortex. *Cereb Cortex* 20:2277-86
- Miles R, Blaesse P, Huberfeld G, Wittner L, Kaila K. 2012. Chloride homeostasis and GABA signaling in temporal lobe epilepsy. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, ed. Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV,. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)
- Milh M, Villeneuve N. 2011. Les absences chez l'enfant : le diagnostic étiologique. *Neurologies* 14:240-3

- Minassian BA, Lee JR, Herbrick JA, Huizenga J, Soder S, et al. 1998. Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* 20:171-4
- Minnery BS, Simons DJ. 2003. Response properties of whisker-associated trigeminothalamic neurons in rat nucleus principalis. *J Neurophysiol* 89:40-56
- Mirsky AF, Vanburen JM. 1965. On the nature of the "absence" in centrencephalic epilepsy: a study of some behavioral electroencephalographic and autonomic factors. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 18:334-48
- Moeller F, LeVan P, Muhle H, Stephani U, Dubeau F, et al. 2010a. Absence seizures: individual patterns revealed by EEG-fMRI. *Epilepsia* 51:2000-10
- Moeller F, Muhle H, Wiegand G, Wolff S, Stephani U, Siniatchkin M. 2010b. EEG-fMRI study of generalized spike and wave discharges without transitory cognitive impairment. *Epilepsy Behav* 18:313-6
- Morison R, Dempsey E. 1942. A study of thalamo-cortical relations. *Am J Physiol* 135:281-92
- Mountcastle VB. 1957. Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol* 20:408-34
- Nadeau S, Ferguson T, Valenstein E, Vierck C, Petruska J, et al. 2006. *Neurosciences Médicales*. 569 pp.
- Nicolelis MA, Fanselow EE. 2002. Thalamocortical optimization of tactile processing according to behavioral state. *Nat Neurosci* 5:517-23
- Niedermeyer E. 1996. Primary (idiopathic) generalized epilepsy and underlying mechanisms. *Clin Electroencephalogr* 27:1-21
- Olsson I. 1988. Epidemiology of absence epilepsy. I. Concept and incidence. *Acta Paediatr Scand* 77:860-6
- Orren MM. 1978. Evoked potential studies in petit mal epilepsy. Visual information processing in relation to spike and wave discharges. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*:251-7
- Panayiotopoulos C. 2005a. Idiopathic generalised epilepsies. In *The epilepsies: seizures, syndromes and management*, ed. Panayiotopoulos C. pp. 271-348. Oxford: Bladon Medical Publishing

- Panayiotopoulos CP. 1999. Typical absence seizures and their treatment. *Arch Dis Child* 81:351-5
- Panayiotopoulos CP. 2001. Treatment of typical absence seizures and related epileptic syndromes. *Paediatr Drugs* 3:379-403
- Panayiotopoulos CP. 2005b. Syndromes of idiopathic generalized epilepsies not recognized by the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 46: Suppl 9:57-66
- Panayiotopoulos CP. 2008. Typical absence seizures and related epileptic syndromes: assessment of current state and directions for future research. *Epilepsia* 49:2131-9
- Panayiotopoulos CP, Koutroumanidis M, Giannakodimos S, Agathonikou A. 1997. Idiopathic generalised epilepsy in adults manifested by phantom absences, generalised tonic-clonic seizures, and frequent absence status. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63:622-7
- Panayiotopoulos CP, Obeid T, Waheed G. 1989. Differentiation of typical absence seizures in epileptic syndromes. A video EEG study of 224 seizures in 20 patients. *Brain* 112 (Pt 4):1039-56
- Pare D, Steriade M. 1993. The reticular thalamic nucleus projects to the contralateral dorsal thalamus in macaque monkey. *Neurosci Lett* 154:96-100
- Pastor MA, Valencia M, Artieda J, Alegre M, Masdeu JC. 2007. Topography of cortical activation differs for fundamental and harmonic frequencies of the steady-state visual-evoked responses. An EEG and PET H215O study. *Cereb Cortex* 17:1899-905
- Pavlov I, Kaila K, Kullmann DM, Miles R. 2012. Cortical inhibition, pH and cell excitability in epilepsy: what are optimal targets for antiepileptic interventions? *J Physiol*. 13: epub ahead of print
- Pavone P, Bianchini R, Trifiletti RR, Incorpora G, Pavone A, Parano E. 2001. Neuropsychological assessment in children with absence epilepsy. *Neurology* 56:1047-51
- Paxinos G, Watson, C. 1986. *The brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press
- Paz J, Polack PO, Slaght SJ, Deniau JM, Chavez M, Mahon S, Charpier S. 2009. Cortical initiation of absence seizures, propagation to basal ganglia and back to the cortex. In *Pan-brain abnormal neural network in epilepsy*, ed. Tang FR, pp. 41-65. Kerala: Research Signpost

- Paz JT, Chavez M, SAILLET S, Deniau JM, Charpier S. 2007. Activity of ventral medial thalamic neurons during absence seizures and modulation of cortical paroxysms by the nigrothalamic pathway. *J Neurosci* 27:929-41
- Paz JT, Deniau JM, Charpier S. 2005. Rhythmic bursting in the cortico-subthalamo-pallidal network during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. *J Neurosci* 25:2092-101
- Percheron G, Francois C, Talbi B, Yelnik J, Fenelon G. 1996. The primate motor thalamus. *Brain Res Brain Res Rev* 22:93-181
- Pidoux M, Mahon S, Deniau JM, Charpier S. 2011. Integration and propagation of somatosensory responses in the corticostriatal pathway: an intracellular study in vivo. *J Physiol* 589:263-81
- Pinault D. 2003. Cellular interactions in the rat somatosensory thalamocortical system during normal and epileptic 5-9 Hz oscillations. *J Physiol* 552:881-905
- Pinault D, Leresche N, Charpier S, Deniau JM, Marescaux C, et al. 1998. Intracellular recordings in thalamic neurones during spontaneous spike and wave discharges in rats with absence epilepsy. *J Physiol* 509 (Pt 2):449-56
- Plouin P, Kaminska, A, Moutard ML, Soufflet, C. 2006. L'EEG en pédiatrie. pp. 185. Montrouge: John Libbey
- Polack PO, Charpier S. 2006. Intracellular activity of cortical and thalamic neurones during high-voltage rhythmic spike discharge in Long-Evans rats in vivo. *J Physiol* 571:461-76
- Polack PO, Charpier S. 2009. Ethosuximide converts ictogenic neurons initiating absence seizures into normal neurons in a genetic model. *Epilepsia* 50:1816-20
- Polack PO, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A, Charpier S. 2007. Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci* 27:6590-9
- Polack PO, Mahon S, Chavez M, Charpier S. 2009. Inactivation of the somatosensory cortex prevents paroxysmal oscillations in cortical and related thalamic neurons in a genetic model of absence epilepsy. *Cereb Cortex* 19:2078-91

- Preuss T, Goldman-Rakic PS. 1987. Crossed corticothalamic and thalamocortical connections of macaque prefrontal cortex. *J Comp Neurol* 257:269-81
- Rees G, Kreiman G, Koch C. 2002. Neural correlates of consciousness in humans. *Nat Rev Neurosci* 3:261-70
- Roche-Labarbe N, Zaaimi B, Berquin P, Nehlig A, Grebe R, Wallois F. 2008. NIRS-measured oxy- and deoxyhemoglobin changes associated with EEG spike-and-wave discharges in children. *Epilepsia* 49:1871-80
- Roger J, Bureau M, Dravet Ch, Genton P, Tassinari CA, Wolf P. 2005. *Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent*. Londres: John Libbey
- Sachdev RN, Sellien H, Ebner F. 2001. Temporal organization of multi-whisker contact in rats. *Somatosens Mot Res* 18:91-100
- Sadleir LG, Farrell K, Smith S, Connolly MB, Scheffer IE. 2006. Electroclinical features of absence seizures in childhood absence epilepsy. *Neurology* 67:413-8
- Sah P, Faber ES. 2002. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol.* 66:345-53
- Salek-Haddadi A, Friston KJ, Lemieux L, Fish DR. 2003a. Studying spontaneous EEG activity with fMRI. *Brain Res Rev* 43:110-33
- Salek-Haddadi A, Lemieux L, Merschhemke M, Friston KJ, Duncan JS, Fish DR. 2003b. Functional magnetic resonance imaging of human absence seizures. *Ann Neurol* 53:663-7
- Sarkisova K, van Luijtelaar G. 2011. The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:854-76
- Schabus M, Dang-Vu TT, Heib DP, Boly M, Deseilles M, et al. 2012. The Fate of Incoming Stimuli during NREM Sleep is Determined by Spindles and the Phase of the Slow Oscillation. *Front Neurol* 3:40
- Schubert D, Kotter R, Staiger JF. 2007. Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits. *Brain Struct Funct* 212:107-19
- Shoykhet M, Doherty D, Simons DJ. 2000. Coding of deflection velocity and amplitude by whisker primary afferent neurons: implications for higher level processing. *Somatosens Mot Res* 17:171-80

- Silberberg G. 2008. Polysynaptic subcircuits in the neocortex: spatial and temporal diversity. *Curr Opin Neurobiol* 18:332-7
- Silva LR, Amitai Y, Connors BW. 1991. Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science* 251:432-5
- Siren A, Kylliainen A, Tenhunen M, Hirvonen K, Riita T, Koivikko M. 2007. Beneficial effects of antiepileptic medication on absence seizures and cognitive functioning in children. *Epilepsy Behav* 11:85-91
- Sitnikova E. 2010. Thalamo-cortical mechanisms of sleep spindles and spike-wave discharges in rat model of absence epilepsy (a review). *Epilepsy Res* 89:17-26
- Slaght SJ, Leresche N, Deniau JM, Crunelli V, Charpier S. 2002a. Activity of thalamic reticular neurons during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. *J Neurosci* 22:2323-34
- Slaght SJ, Paz T, Chavez M, Deniau JM, Mahon S, Charpier S. 2004. On the activity of the corticostriatal networks during spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy. *J Neurosci* 24:6816-25
- Slaght SJ, Paz T, Mahon S, Maurice N, Charpier S, Deniau JM. 2002b. Functional organization of the circuits connecting the cerebral cortex and the basal ganglia: implications for the role of the basal ganglia in epilepsy. *Epileptic Disord* 4: Suppl 3:S9-22
- Spiegel E, Wycis HT. 1950. Thalamic recordings in man with special reference to seizure discharges. *EEG Clin Neurophysiol* 2:23-7
- Staiger JF, Flaggmeyer I, Schubert D, Zilles K, Kotter R, Luhmann HJ. 2004. Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. *Cereb Cortex* 14:690-701
- Steriade M. 2000. Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience* 101:243-76
- Steriade M. 2001. Active neocortical processes during quiescent sleep. *Arch Ital Biol* 139:37-51
- Steriade M. 2004. Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat Rev Neurosci* 5:121-34
- Steriade M, EG J, McCormick. 1997. *Thalamus Vol. I: organisation and function*. Amsterdam. 959 pp.

- Steriade M, Jones, GJ, Llinas, RR. 1990. *Thalamic oscillations and signaling*. New York: John Wiley. 429 pp.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ. 1993. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262:679-85
- Strauss U, Kole MH, Brauer AU, Pahnke J, Bajorat R, et al. 2004. An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci* 19:3048-58
- Suls A, Mullen SA, Weber YG, Verhaert K, Ceulemans B, et al. 2009. Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1. *Ann Neurol* 66:415-9
- Szaflarski JP, DiFrancesco M, Hirschauer T, Banks C, Privitera MD, et al. 2010. Cortical and subcortical contributions to absence seizure onset examined with EEG/fMRI. *Epilepsy Behav* 18:404-13
- Tan HO, Reid CA, Single FN, Davies PJ, Chiu C, et al. 2007. Reduced cortical inhibition in a mouse model of familial childhood absence epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17536-41
- Tanaka M, Olsen RW, Medina MT, Schwartz E, Alonso ME, et al. 2008. Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am J Hum Genet* 82:1249-61
- Tenney JR, Duong TQ, King JA, Ferris CF. 2004. FMRI of brain activation in a genetic rat model of absence seizures. *Epilepsia* 45:576-82
- Tenney JR, Duong TQ, King JA, Ludwig R, Ferris CF. 2003. Corticothalamic modulation during absence seizures in rats: a functional MRI assessment. *Epilepsia* 44:1133-40
- Thomas P, Genton P, Gelisse P, Wolf P. 2005. Epilepsie myoclonique juvénile. In *Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent*, ed. DC Roger J, Genton P, Tassinari CA, Wolf P. Londres: John Libbey
- Tich SN, Pereon Y. 1999. Semiological seizure classification. *Epilepsia* 40:531
- Timofeev I, Steriade M. 2004. Neocortical seizures: initiation, development and cessation. *Neuroscience* 123:299-336
- Tsai MH, Hsu SP, Huang CR, Chang CS, Chuang YC. 2010. Transient attenuation of visual evoked potentials during focal status epilepticus in a patient with occipital lobe epilepsy. *Acta Neurol Taiwan* 19:131-6

- Tsakiridou E, Bertollini L, de Curtis M, Avanzini G, Pape HC. 1995. Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J Neurosci* 15:3110-7
- Tucker DM, Brown M, Luu P, Holmes MD. 2007. Discharges in ventromedial frontal cortex during absence spells. *Epilepsy Behav* 11:546-57
- Urena-Hornos T, Rubio-Rubio R, Gros-Esteban D, Cabrerizo de Diago R, Pena-Segura JL, Lopez-Pison J. 2004. Absence epilepsy. A review of our 14 years' experience. *Rev Neurol* 39:1113-9
- Van Horn SC, Erisir A, Sherman SM. 2000. Relative distribution of synapses in the A-laminae of the lateral geniculate nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 416:509-20
- van Luijtelaar EL, Drinkenburg WH, van Rijn CM, Coenen AM. 2002. Rat models of genetic absence epilepsy: what do EEG spike-wave discharges tell us about drug effects? *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 24 Suppl D:65-70
- Vega C, Vestal M, DeSalvo M, Berman R, Chung M, et al. 2010. Differentiation of attention-related problems in childhood absence epilepsy. *Epilepsy Behav* 19:82-5
- Veinante P, Deschenes M. 1999. Single- and multi-whisker channels in the ascending projections from the principal trigeminal nucleus in the rat. *J Neurosci* 19:5085-95
- Veinante P, Lavallee P, Deschenes M. 2000. Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissal barrel cortex in the rat. *J Comp Neurol* 424:197-204
- Vergnes M, Marescaux C. 1992. Cortical and thalamic lesions in rats with genetic absence epilepsy. *J Neural Transm Suppl* 35:71-83
- Vergnes M, Marescaux C, Boehrer A, Depaulis A. 1991. Are rats with genetic absence epilepsy behaviorally impaired? *Epilepsy Res* 9:97-104
- Vergnes M, Marescaux C, Depaulis A. 1990. Mapping of spontaneous spike and wave discharges in Wistar rats with genetic generalized non-convulsive epilepsy. *Brain Res* 523:87-91
- Vialatte FB, Maurice M, Dauwels J, Cichocki A. 2010. Steady-state visually evoked potentials: focus on essential paradigms and future perspectives. *Prog Neurobiol* 90:418-38

- Wang CP, Hsieh PF, Chen CC, Lin WY, Hu WH, et al. 2005a. Hyperglycemia with occipital seizures: images and visual evoked potentials. *Epilepsia* 46:1140-4
- Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Jhung S, et al. 2005b. Glut-1 deficiency syndrome: clinical, genetic, and therapeutic aspects. *Ann Neurol* 57:111-8
- Watts J, Thomson AM. 2005. Excitatory and inhibitory connections show selectivity in the neocortex. *J Physiol* 562:89-97
- Westmijse I, Ossenblok P, Gunning B, van Luijtelaar G. 2009. Onset and propagation of spike and slow wave discharges in human absence epilepsy: A MEG study. *Epilepsia* 50:2538-48
- Wilent W, Contreras D. 2004. Synaptic responses to whisker deflections in rat barrel cortex as a function of cortical layer and stimulus intensity. *J Neurosci.* 24:3985-98
- Williams D. 1953. A study of thalamic and cortical rhythms in petit mal. *Brain* 76:50-69
- Williams SR, Stuart GJ. 2000. Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I(h) in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83:3177-82
- Wirrell EC, Camfield CS, Camfield PR, Dooley JM, Gordon KE, Smith B. 1997. Long-term psychosocial outcome in typical absence epilepsy. Sometimes a wolf in sheeps' clothing. *Arch Pediatr Adolesc Med* 151:152-8
- Wise S, Jones EG. 1977. Cells of origin and terminal distribution of descending projections of the rat somatic sensory cortex. *J Comp Neurol* 175:2:129-57
- Wolf PeI, Y. 2005. L'épilepsie-absence juvénile. In *Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent* ed. Roger J, Dravet Ch, Genton P, Tassinari CA, Wolf P, pp. 363-6. Londres: John Libbey
- Wright AK, Norrie L, Arbuthnott GW. 2000. Corticofugal axons from adjacent 'barrel' columns of rat somatosensory cortex: cortical and thalamic terminal patterns. *J Anat* 196 (Pt 3):379-90
- Wynnanski-Jaffe T, Panton CM, Buncic JR, Westall CA. 2009 Paradoxical robust visual evoked potentials in young patients with cortical blindness. *Doc Ophthalmol.* 119:101-7

- Yalcin O. 2012. Genes and molecular mechanisms involved in the epileptogenesis of idiopathic absence epilepsies. *Seizure* 21:79-86
- Zarrinpar A, Callaway EM. 2006. Local connections to specific types of layer 6 neurons in the rat visual cortex. *J Neurophysiol* 95:1751-61
- Zheng T, Clarke AL, Morris MJ, Reid CA, Petrou S, O'Brien TJ. 2009. Oxcarbazepine, not its active metabolite, potentiates GABA_A activation and aggravates absence seizures. *Epilepsia* 50:83-7