



**HAL**  
open science

# Application du carisbamate comme agent neuroprotecteur et modificateur de l'épileptogénèse dans le modèle Lithium-Pilocarpine : évaluation de l'expression protéique et des altérations neurochimiques cérébrales

Jose Eduardo Marques Carneiro da Silva

## ► To cite this version:

Jose Eduardo Marques Carneiro da Silva. Application du carisbamate comme agent neuroprotecteur et modificateur de l'épileptogénèse dans le modèle Lithium-Pilocarpine : évaluation de l'expression protéique et des altérations neurochimiques cérébrales. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg; Universidade de São Paulo (Brésil), 2015. Français. NNT : 2015STRAJ016 . tel-01360366

**HAL Id: tel-01360366**

**<https://theses.hal.science/tel-01360366v1>**

Submitted on 5 Sep 2016

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

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

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives – Strasbourg

ET

*DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA*

Disciplina de Neurociência – São Paulo

## THÈSE présentée par :

**José Eduardo MARQUES CARNEIRO DA SILVA**

soutenue le : 14 Avril 2015

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

## **Application du carisbamate comme agent neuroprotecteur et modificateur de l'épileptogénèse dans le modèle Lithium-Pilocarpine : évaluation de l'expression protéique et des altérations neurochimiques cérébrales**

**THÈSE dirigée par :**

**M. CASSEL Jean-Christophe**

Dr. Prof., université de Strasbourg

**M<sup>me</sup> DA SILVA FERNANDES Maria José**

Dr. Prof., universidade Federal de São Paulo

**RAPPORTEURS :**

**M<sup>me</sup> Bouilleret Viviane**

Dr. Prof., hôpitaux universitaires Paris-Sud

**M. PEREIRA LEITE João**

Dr. Prof., universidade estadual de são Paulo

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M<sup>me</sup> NEHLIG Astrid**

Dr. Prof., université de Strasbourg

**M<sup>me</sup> LOPES CENDES Iscia Teresinha**

Dr. Prof., universidade estadual de campinas

## DÉDICACE

Je dédie cette thèse à Julie, mon épouse aimée, pour être toujours à mes côtés. Elle a bouleversé toute sa vie pour me suivre, a laissé son travail, ses parents, sa sœur et ses amis pour m'accompagner, ce dont je lui suis très reconnaissant. Elle a traversé tout un océan, pour aller habiter dans un pays étranger, elle a dû apprendre une nouvelle langue et habiter dans une ville gigantesque telle que São Paulo. Elle a participé activement à la réalisation de cette thèse, ce qui a été pour moi une aide essentielle dans pratiquement TOUTES les expérimentations. Elle est, à de nombreuses reprises restée avec moi au laboratoire jusqu'à très tard dans la nuit (1h voire 2h du matin) peu importe, si c'était samedi ou dimanche.

A cette personne incomparable et inestimable.

A cette personne pleine de bonté et de pureté.

A cette personne que j'aime tellement !

Enfin, cette thèse est aussi à toi !

Je t'aime

## REMERCIEMENT

Avant tout je remercie le Grand Architecte de l'Univers pour toutes les occasions et possibilités que j'ai dans ma vie.

Je remercie ma mère, pour être cette personne merveilleuse et pour m'avoir transmis les valeurs essentielles qui sont les miennes aujourd'hui et font partie de ma personnalité. Je remercie mon père, de m'avoir soutenu dans les moments les plus importants de ma vie. Je remercie Yone, qui m'est une deuxième mère, pour sa gentillesse et son soutien durant toutes ces années. Je remercie mon grand frère, Igor, dont j'ai beaucoup appris et pour tous les moments extraordinaires, les conseils, le soutien, qu'il m'a donnés. Merci à ma petite sœur, Carol qui est un grand exemple pour moi (même si elle ne le sait pas vraiment), pour les bons moments et tout simplement pour exister. Je remercie Barbara, ma gentille belle-sœur, dont la petite princesse Alice, nous procure des moments si joyeux. Je remercie mes nièces, Laís et Alice, qui illuminent ma vie. Je vous aime tous !

Je remercie ma nouvelle famille, mon épouse Julie et ma belle-mère Dominique, qui m'ont tant aidé dans la difficile tâche de traduire cette thèse en un si petit délai de temps. Je remercie mon beau-père, Bernhard, pour tous les conseils, les conversations enrichissantes, le soutien et les bons moments que nous avons passés ensemble. Je remercie ma belle-sœur, Hélène et Ahmet, son mari, ces agréables personnes avec lesquelles j'ai pu partager de joyeux moments, et qui vont nous donner aussi une petite princesse, Ayla. Je vous aime !

Je remercie Elias, mon maître de Capoeira, que je considère aussi comme un deuxième père qui m'a accompagné depuis mes 10 ans. Je remercie tous mes frères et sœurs, de la capoeira, M. Banana, Galiléo, Très Semanas, Alemão, Xuxa, Tyson, Mark, Brigadeiro, M. Tião, M. Torneiro, M. China, Patativa, Parabólica, Kuxilo, Renato, Mascara et beaucoup d'autres qui sont dans mon cœur. J'ai l'honneur de pouvoir dire que j'appartiens à cette famille qui est l'Escola de Capoeira Grupo Senzala.

Je remercie mes élèves à l'époque et amis aujourd'hui, Geoffrey (Cachaça), Hervé (Desculpa), Sylvain (Baixinho), Odile (Morangeiro), Virginie (Sargenta), Jordan (Bigodinho), Pascale (Pé Azul), Maryline (Vermelha), Geraldine (Batatinha), Aurelien (Frente), Marc (Salsicha), Gwénaelle (Negativa), Johan (Bracinho), Murielle et bien-sûr Cecilia et Chris, et tous les autres élèves et amis que j'ai eu le plaisir de connaître durant ma période Strasbourgeoise et qui m'ont apporté tant de joyeux moments.

Je remercie les trois personnes qui m'ont accueilli en tant qu'étudiant dans ce chemin qui est la carrière de scientifique. Le Prof. Dr. Jean-Christophe Cassel (JC), qui m'a accompagné dès les premières semaines du Master, lors du projet tutoré, qui a été mon tuteur dans le cadre du stage de Master, et m'a aussi accueilli dans son laboratoire pour la réalisation de ce Doctorat. Pour toutes les expériences et enseignements qu'il m'a prodigués durant ces années, je lui suis reconnaissant. Je remercie la Prof. Dr. Astrid Nehlig, pour avoir cédé à mon INSISTANTE demande de m'accepter comme étudiant lors du stage de Master, et en doctorat et pour avoir contribué à ma croissance tant professionnelle que personnelle, par ses conseils avisés et son enseignement. Je remercie la Prof. Dr. Maria José da Silva Fernandes (Zezé), de m'avoir accepté en tant qu'étudiant

pour ce doctorat au cours duquel j'ai appris tant de choses. Merci aussi de nous avoir gentiment aidés d'innombrables fois, Julie et moi. Pour cela, je vous exprime ma profonde gratitude, sans vous trois je n'aurais pas pu accomplir ce travail.

Je remercie tous les professeurs de la Discipline de Neurologie/Neuroscience : Maria da Graça Naffah Mazzacoratti, Fúlvio Alexandre Scorza, Carla Alessandra Scorza, Débora Amado Scerni, et Esper Abrão Cavalheiro pour le soutien, la motivation et les exemples qu'ils sont.

Je remercie Daniela Persike, de m'avoir appris et aidé durant l'étude de protéomique. Je remercie Anne Pereira de Vasconcelos de m'avoir formé au comptage par stéréologie. Je remercie Dudu, Joíse et Paulinha de m'avoir aidé avec la quantification des acides aminés et monoamines par HPLC. Je remercie Rebeca de m'avoir appris la technique de western blotting. Je remercie également Luis, Jean-Baptiste Faure (JBF), Estelle, Arielle, Brigitte et Karine pour toute leur aide et leur soutien dans les différentes expérimentations de cette thèse. Sans vous ce travail n'existerait pas.

Je remercie tous les amis du laboratoire de la Prof. Zezé : Dani, Rebeca, Luis, Michelle, Gabriela et Vassiliki pour l'ambiance favorable dans laquelle j'ai pu travailler de manière facile et agréable. J'ai également apprécié leur amitié et leur soutien dans les manipulations. Ce travail est aussi le fruit de vos collaborations. Merci.

Je remercie tous les amis des laboratoires de l'UNIFESP : Dudu, Sandrinha, Telma, Joíse, Priscila, Paula, Paulo, Anna Karynna, Carol, Karoll, Janise, José Cláudio, Eliza, Márcia, Mariana, Manaira, Elane et Selvin, pour l'ambiance conviviale dans laquelle nous avons travaillé ces années.

Je remercie tous les fonctionnaires de l'UNIFESP : Edvaldo, Silvando, Luizinho, Renato, Mayara et dona Rosinha pour leur attention, leur aide et leur convivialité.

Je remercie tous les professeurs et les amis du LNCA et de l'INSERM 666 : Christian Kelche, Alexandra Barbelivien, Monique Majchrzak, Chantal Mathis, Anne-Laurence Boutiller, Pascale Romieu, JBF, Jean-Bastien Bott (JBB), Thibaut Cholvin, Raphaëlle Cassel, Michaël Loureiro, Lucas Lecourtier, Estelle Koning, Arielle Ferrandon, Brigitte Cosquer, Karin Herbaux, Fanny Fuchs, Snehajyoti (Jyoti), Mohamad Ali et Romain Goutagny d'avoir créé une ambiance si agréable au labo durant mon séjour en France, et les bons souvenirs que j'emmènerai toujours avec moi.

Je remercie le Prof Altay Lino de Souza, pour l'attention, l'aide avec les statistiques et pour tout l'enseignement qu'il m'a transmis.

Je remercie la CAPES, le CNPq, la FAPESP et l'INNT pour tout le support financier qui a permis ce travail.

Je remercie l'Ecole Doctorale Science de la Vie et Santé – UNISTRA, pour tout le soutien donné durant cette période, et qui a beaucoup contribué à la réalisation de cette thèse.

Je remercie le Laboratoire National de Lumière Síncrotron (LNLS), pour sa collaboration dans le cadre de l'analyse des échantillons de la protéomique lors de l'identification par spectrométrie de masse. Merci beaucoup pour cet impeccable travail.

Je remercie le Prof. Dr. Antônio Carlos Magalhães, directeur de l'EPM, qui m'a donné accès au congrès international organisé par la Society For Neuroscience (SFN) à

Washington en 2014 au cours duquel j'ai pu présenter une partie des résultats de cette thèse. Merci beaucoup, votre aide a été essentielle.

Je remercie l'Université de Strasbourg – UNISTRA, l'Université Fédérale de São Paulo – UNIFESP et l'École Paulista de Medicina – EPM de m'avoir offert la possibilité de réaliser ce travail.

Rire, c'est risquer de sembler fou,  
Pleurer c'est risquer de paraître sentimental,  
Tendre la main à l'autre, c'est risquer de s'engager,  
Montrer ses sentiments, c'est risquer de dévoiler son intimité,  
Exposez ses idées et ses rêves à la vue de tous c'est risquer le discrédit,  
Aimer, c'est risquer l'abandon,  
Vivre, c'est risquer de mourir,  
Espérer, c'est risquer le désespoir,  
Essayer c'est risquer l'échec.

Mais ... il faut risquer,  
Car le plus grand risque dans la vie est de ne prendre aucun risque,

Celui qui ne risque rien, ne fait rien, n'est rien,  
Il évite peut-être la souffrance et le chagrin,  
Mais ne peut apprendre, ni ressentir, ni changer, ni progresser, ni vivre,  
Enchaîner dans ses certitudes, il est esclave,  
Et a perdu toute liberté,  
Seule celui qui prend des risques est libre.

" Se risquer c'est perdre pied pendant un certain temps.  
Ne rien risquer c'est perdre la vie ... "

*Soren Kierkegaard*

## SOMMAIRE

DÉDICACE.....	II
REMERCIEMENT.....	III
LISTE DE FIGURES.....	X
LISTE DE TABLEAUX .....	XII
LISTE D'ABREVIATIONS .....	XIII
INTRODUCTION.....	18
1.1. L'ÉPILEPSIES.....	18
1.2. L'ÉPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL (ELT) .....	20
1.2.1. Le lobe temporal .....	20
1.2.1.1. <i>L'hippocampe</i> .....	20
1.2.1.2. <i>Le cortex entorhinal</i> .....	21
1.2.1.3. <i>Le cortex piriforme</i> .....	22
1.2.1.4. <i>L'Amygdale</i> .....	23
1.2.1.5. <i>Le thalamus</i> .....	24
1.2.2. Étiologie de l'ELT .....	26
1.2.3. Epileptogenèse.....	29
1.2.4. La physiopathologie de l'ELT .....	29
1.2.5. Altérations neurochimiques de l'ELT .....	30
1.2.6. Modèle d'épilepsie lésionnel induite par la pilocarpine .....	32
1.2.7. Stratégies de neuroprotection.....	35
1.3. CARISBAMATE .....	36
1.3.1. Essais précliniques .....	37
1.3.2. Essais cliniques.....	39
1.3.3. Mécanismes d'action : .....	42
OBJETIFS.....	44
MÉTHODES .....	46
3.1. INDUCTION DU SE ET TRAITEMENT PAR LE CARISBAMATE .....	46
3.2. LES GROUPES EXPERIMENTAUX .....	49
3.3. IMMUNOHISTOCHIMIE POUR MARQUAGE DE LA PROTEINE C-FOS.....	49
3.4. DELINEATION DES REGIONS D'INTERET .....	50
3.5. STEREOLOGIE .....	51
3.6. DOSAGE DES ACIDES AMINES ET DES MONOAMINES PAR HPLC .....	52



3.7.	PROTEOMIQUE.....	53
3.7.1.	Électrophorèse en deux dimensions .....	54
3.7.2.	Densitométrie .....	54
3.7.3.	Digestion en gel .....	55
3.7.4.	Analyse en nano-LC-ESI-MS/MS .....	55
3.7.5.	Interactome .....	56
3.7.6.	Western Blot .....	57
3.8.	ANALYSE STATISTIQUE .....	59
	RESULTATS .....	61
4.1.	ACTIVATION CEREBRALE PAR MARQUAGE DE LA PROTEINE C-FOS. ....	61
4.2.	MONOAMINES ET ACIDES AMINES .....	66
4.2.1.	<i>L'hippocampe.</i> .....	66
4.2.2.	<i>Le thalamus</i> .....	68
4.2.3.	<i>Le cortex piriforme</i> .....	70
4.3.	PROTEOMIQUE.....	72
4.3.1.	Interactome .....	75
4.3.2.	Confirmation par western blotting .....	77
	DISCUSSION.....	80
5.1.	ALTERATION DANS L'ACTIVITE CEREBRALE .....	81
5.2.	MONOAMINES ET ACIDES AMINEES .....	84
5.3.	ÉTUDE DU PROFIL PROTEIQUE DU MODELE LI-PILO .....	87
5.4.	RELATION ENTRE L'ELT ET L'EPILEPSIE ABSENCE .....	94
	CONCLUSION .....	97
	PERSPECTIVES .....	99
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE .....	101
	ANNEXES.....	115
	ANNEXE 1 – AVIS DU COMITE D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE, UNIVERSITE FEDERALE DE SÃO PAULO.....	115
	ANNEXE 2 – LISTE DE PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	117
	CHAPITRE DE LIVRE.....	117
	Maria José da Silva Fernandes, Rebeca Padrão Amorim, José Eduardo Marques Carneiro, Michelle Gasparetti Leão Araújo, Daniele Suzete Persike (2013). "Proteomics-Based Strategy to Identify Biomarkers and Pharmacological Targets in Temporal Lobe Epilepsy". In: <i>Pharmacoresistance in Epilepsy: From Genes and Molecules to Promising Therapies</i> (Luisa Rocha, Esper A. Cavalheiro). Springer, pp 115-126. (DOI 10.1007/978-1-4614-6464-8_8).....	117

<b>ARTICLE DE REVUE</b> .....	117
<p>Maria Jose da Silva Fernandes, <b>José Eduardo Marques-Carneiro</b>, Rebeca Padrão Amorim, Michelle Gasparetti Leao Araujo, Astrid Nehlig. (2015). "Neuroprotective agents and modulation of temporal lobe epilepsy". <i>Front Biosci, Elite</i>, 7, 1 – 1 (DOI:10.2741/E719).....</p>	
<b>ARTICLES PUBLIES</b> .....	117
<p><b>José Eduardo Marques-Carneiro</b>, Jean-Baptiste Faure, Brigitte Cosquer, Estelle Koning, Arielle Ferrandon, Anne Pereira de Vasconcelos, Jean-Christophe Cassel, et Astrid Nehlig. (2014). "Anxiety and locomotion in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS): Inclusion of Wistar rats as a second control". <i>Epilepsia</i> 55 :1460-8. (DOI: 10.1111/epi.12738) .....</p>	
<p>Faure JB, Akimana G, <b>Carneiro JE</b>, Cosquer B, Ferrandon A, Geiger K, Koning E, Penazzi L, Cassel JC, Nehlig A. (2013). "A comprehensive behavioral evaluation in the lithium-pilocarpine model in rats: Effects of carisbamate administration during status epilepticus". <i>Epilepsia</i> 54.1203-13. (DOI: 10.1111/epi.12219).....</p>	
<p>Faure JB, <b>Marques-Carneiro JE</b>, Akimana G, Cosquer B, Ferrandon A, Herbeaux K, Koning E, Barbelivien A, Nehlig A et Cassel JC. (2014). "Attention and executive functions in a rat model of chronic epilepsy". <i>Epilepsia</i> 55 :644-53. (DOI: 10.1111/epi. 12549).....</p>	
<b>ARTICLE SOUMIS</b> .....	117
<p><b>José Eduardo Marques-Carneiro</b>, Jean-Baptiste Faure, Alexandra Barbelivien, et Astrid Nehlig, Jean-Christophe Cassel. (2014). "Alterations in memory systems but normal visual attention in the GAERS model of absence epilepsy". <i>Epilepsia</i> (soumis). .....</p>	
<b>ARTICLES EM PREPARATION</b> .....	117
<p><b>José Eduardo Marques-Carneiro</b>, Eduardo Ferreira de Castro-Neto, Luis Sierra, Julia Julie Litzahn, Jean-Christophe Cassel, Maria da Graça Naffah Mazzacoratti, Astrid Nehlig, Maria José da Silva Fernandes. "Acute alterations following carisbamate administration after SE induced by pilocarpina: a map brain activity and neurochemical changes". (em preparation).....</p>	
<p><b>José Eduardo Marques-Carneiro</b>, Daniele Suzete Persike, Rebeca Padrão Amorim, Julia Julie Litzahn, Jean-Christophe Cassel, Astrid Nehlig, Maria José da Silva Fernandes. "Proteomic profile of chronic epileptic rats treated with carisbamate over seven days after SE". (en preparation) .....</p>	

## LISTE DE FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Présentation schématique de la formation hippocampique et de la connexion tri-synaptique (The hippocampus book).....	21
<b>Figure 2:</b> Chronologie de l'ELT humaine.....	28
<b>Figure 3:</b> Modèle de la pilocarpina (d'après Cavalheiro et al., 1983; et Leite et al., 1990).....	34
<b>Figure 4 :</b> Structure moléculaire du Carisbamate (CRS ; RWJ-333369 ; S-2-O-carbamoyl-1-o-chlorophenyl-ethanol).....	36
<b>Figure 5:</b> Design expérimental.....	48
<b>Figure 6 :</b> Schéma de définition des régions d'intérêt.....	51
<b>Figure 7:</b> Moyenne $\pm$ 95% IC du nombre de cellules marqué avec la protéine c-Fos : A) noyau paraventriculaire - PV; B) noyau intralaminaire - IL; C) noyau reuniens e rhomboïde - ReRh; D) noyau latérodorsal - LD; E) noyau médiodorsal - MD; F) noyau réticulaire do thalamus - NRT; G) complexe ventrobasal - VB; H) noyau sous-talhamique zona incerta - ZI; I) Gyrus denté - GD; J) CA1; K) CA3; L) amygdala - Amy; M) cortex piriforme - Pir; e N) cortex entorhinal – Ent. Dans la figure O) nous avons le facteur 1 e 2 obtenu par l'analyse factorielle. Codes : Différence par rapport au groupe CT (* $p < 0,05$ ) ; différence par rapport au groupe DZP (# $p < 0,05$ ).....	62
<b>Figure 8 :</b> Marquage des cellules c-Fos-positives dans les noyaux MD et LD du thalamus.....	63
<b>Figure 9:</b> Matrice de dispersion des régions incluses dans le facteur 2 de l'analyse factorielle. MD – médiodorsal ; VB – Ventrobasal ; LD – latérodorsal ; GD – gyrus denté.....	65
<b>Figure 10 :</b> Acides aminés et monoamines dans l'hippocampe : VMA - acide vanillylmandélique ; NA - Noradrénaline; DOPAC - Acide 3,4-hydroxyphénylacétique ; DA - Dopamine; 5-HIAA - acide 5-hydroxyindolacético; HVA – acide homovanillique ; 5-HT - Serotonine; ASP - Aspartate; GLU - Glutamate; GLN - Glutamine; GLy - Glycine; TAU – Taurine; GABA – Acide gamma aminobutyrique. Codes : * $p < 0,05$ .....	67
<b>Figure 11 :</b> Acides aminés et monoamines dans le thalamus: VMA - acide vanillylmandélique ; NA - Noradrénaline; DOPAC - Acide 3,4-hydroxyphénylacétique ; DA - Dopamine; 5-HIAA - acide 5-hydroxyindolacético; HVA – acide homovanillique ; 5-HT - Serotonine; ASP - Aspartate; GLU - Glutamate; GLN - Glutamine; GLy - Glycine; TAU – Taurine; GABA – Acide gamma aminobutyrique. Codes * $p < 0,05$ .....	69

**Figure 12 :** Acides aminés et monoamines dans le cortex piriforme: VMA - acide vanillylmandélique ; NA - Noradrénaline; DOPAC - Acide 3,4-hydroxyphénylacétique ; DA - Dopamine; 5-HIAA - acide 5-hydroxindolacético; HVA – acide homovanillique ; 5-HT - Serotonine; ASP - Aspartate; GLU - Glutamate; GLN - Glutamine; GLy - Glycine; TAU – Taurine; GABA – Acide gamma aminobutyrique. Codes \*  $p < 0,05$ ..... 71

**Figure 13 :** Gel de séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle de l'hippocampe des différents groupes. .... 72

**Figure 14 :** Image d'un gel du groupe CT indiquant la position des protéines identifiés. .... 75

**Figure 15 :** A) Illustration de l'analyse de l'interactome incluant les 24 protéines d'intérêt (en rouge) et les 20 autres protéines incluent par le système GENEmania (en gris), identifiées en jeune nous avons les protéines qui participent au métabolisme des carbohydrates (B), à la régénération cellulaire (C), biosynthèse de ATP (D), activité d'ATPase (E) et métabolisme do pyruvate (F). .... 76

**Figure 16 :** Représentation schématique de la glycolyse et de la respiration cellulaire. 77

**Figure 17 :** Quantification des protéines Pkm2, Pdhb, Pebp1 et Dpysl2 par western blotting. .... 78

## LISTE DE TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Quantification de cellules c-Fos positives .....	61
<b>Tableau 2</b> : Analyse factorielle de l'expression de la protéine c-Fos.....	64
<b>Tableau 3</b> : Concentration de monoamines et acides aminés dans l'hippocampe.....	66
<b>Tableau 4</b> : Concentration de monoamines et acides aminés dans le thalamus .....	68
<b>Tableau 5</b> : Concentration de monoamines et acides aminés dans le cortex piriforme .	70
<b>Tableau 6</b> : Protéines différenciellement exprimés dans l'hippocampe des rats. ....	73
<b>Tableau 7</b> : Confirmation de l'expression des protéines Pkm2 ; Pdhb ; Pebp1 et Dpysl2 par western blotting.....	77

## LISTE D'ABREVIATIONS

- 5-HIAA** - acide acétique indole 5-hydroxy
- 5-HT** - Sérotonine
- 5-HT<sub>1A</sub>** – Récepteur de sérotonine de type 1A
- Aco2** - Aconitase
- Adam17** - ADAM métallopeptidase 17; aussi appelé TACE
- ADN** - acide désoxyribonucléique
- ADP** – Adénosine diphosphate
- Aldoa** – Aldolase A
- Aldoc** - Aldolase C
- Amy** - Amygdala
- ANOVA** - Analyse de Variance
- Arhgdia** – Protéine inhibitrice de dissociation Rho GDP
- ASP** - Aspartate
- ATP** – Adenosine triphosphate
- Atp5a1** – ATP synthèse ; aussi appelé complexe V mitochondrial,
- AUF1** – Facteur 1 riche en AU
- BLA** - Noyau basolateral de l'amygdala
- BSA** - Sérum d'albumine bovin
- CA1** - Cornu Ammonis 1
- CA2** - Cornu Ammonis 2
- CA3** – Cornu Ammonis 3
- CE** - Coefficient d'erreur
- c-Fos** – Protéine proto-oncogénique
- CHL1** - Protéine d'adhésion cellulaire 1
- Ckmt1** – Créatine kinase de tipo1
- CRS** - Carisbamate
- CRS-EA** – Carisbamate - Crises d'absence
- CRS-ELT** – Carisbamate – Crises limbiques
- CT** - Groupe contrôle
- DA** - Dopamine
- DO** - Densitométrie optique
- DOPAC** - acide 3,4-dihydroxyphénylacétique

**DPO** - décharge de pointe-onde  
**Dpysl2** – Protéine dihydropyrimidinase 2  
**DZP** - diazepam  
**EESR** - Événements épileptiformes spontanées récurrentes  
**EGFR** - Facteur de croissance épidermique  
**eIF4G** - facteur 4 d'initiation de la traduction eucaryote  
**ELT** - Epilepsie du Lobe Temporal  
**Eno2** – Enolase 2  
**Eno4** – Enolase 4  
**Ent** - Cortex Entorhinal  
**ERBB4** – Récepteur de la protéine tyrosine kinase  
**GABA** - l'acide gamma-aminobutyrique  
**GAERS** - Genetic Absence Epilepsy rats From Strasbourg  
**Gap43** – Neuromoduline ; protéine 43 associé à la croissance ;  
**Gapdh** – Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase  
**GD** – Gyrus denté  
**GDP** – Guanine diphosphate  
**GLI** - Glycine  
**GLN** - Glutamine  
**GLU** - Glutamate  
**GluR1** - récepteur métabotrope glutamatergique du type 1  
**Gnai1** – Sous-unité alpha de la protéine de liaison de nucleotide G (i)  
**GO id** - identificateurs GO  
**GTP** – Guanine triphosphate  
**HPLC** - Chromatographie liquide à haute pression  
**HSF1** - facteur de transcription 1 de choc thermique  
**Hsp40** – Protéine de choc thermique 40  
**Hsp70** - Protéine de choc thermique 70  
**Hsp90** - Protéine de choc thermique 90  
**Hspa8** – Protéine cognat de choc thermique 70; ou Hsc70  
**ILAE** -International League Against Epilepsy  
**IM** – Noyau thalamique intermediolateral  
**Ina** – Internexine alpha  
**LD** - Noyau thalamique laterodorsal

**LDH** - Lactate déshydrogénase  
**Ldhb** – Chaîne B de la protéine lactate déshydrogénase  
**Li-Pilo** – Modèle d'épilepsie du lobe temporal induit par la pilocarpine associée au lithium  
**MAE** – Médicament antiépileptique  
**MD** - Noyau thalamique mediodorsal  
**MDc** – Partie centrale du noyau thalamique mediodorsal  
**MDl** – Partie latérale du noyau thalamique mediodorsal  
**MDm** - Partie médiane du noyau thalamique mediodorsal  
**ME** - 2-mercaptoéthanol  
**MHPG** – Acide 3-méthoxy-4-diidrophenilglycol  
**Mw** - Poids moléculaire  
**Myh6** – Protéine miosine 6  
**NA** - Noradrénaline  
**NEC** – Non Epileptic Control  
**NGF** - Facteur de croissance nerveuse  
**NOTCH** – Protéine homologue au locus neurogénique 1  
**NRT** - Noyau réticulaire thalamique  
**OPA** - Ohtalaldéhyde  
**PABP** - protéine de liaison de la queue de poly-A  
**PDH** - Complexe catalytique pyruvate déshydrogénase  
**Pebp1** - Protéine 1 de liaison à la phosphatidyléthanolamine  
**Pi** – Phosphate inorganique  
**pI** - Point isoélectrique  
**Pir** - Cortex Piriforme  
**Pkm** – Protéine Kinase  
**PV** – Noyau thalamique paraventriculaire  
**PVDF** - Polyfluorure de vinylidène  
**ReRh** – Noyau thalamique reuniens et rhomboïde  
**SE** - Status Epilepticus  
**SH** - Sclérose hippocampique  
**Sncα** – Alfa synucléine  
**TACE** - enzyme de conversion du TNF-alpha  
**TAU** - Taurine  
**TBS-T** - Tampon de tris base avec tween



**TCA** - cycle d'acide tricarboxylique; ou Cycle de Krebs

**Tubb2c** – Chaîne beta 2C de la tubuline

**UGT** – uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase

**VB** – Complexe Ventrobasal du thalamus

**Wag/Rij** - Wistar Albino Glaxo/Rij

**WAS** – Wistar Audiogenic Sensitives

**WHO** – World Health Organization; Organisation Mondiale de la Santé

**ZI** – Zona Incerta

# **Introduction**

# **1. INTRODUCTION**

## **1.1. L'ÉPILEPSIES**

L'épilepsie est considérée comme une maladie neurologique chronique. C'est la maladie neurologique la plus courante après la migraine. Il s'agit d'un trouble cérébral grave touchant environ 50 millions de personnes dans le monde, indépendamment de l'âge, de l'ethnie ou de la classe sociale (Banerjee et al., 2009). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization - WHO), environ 80% des cas se trouvent dans les pays en voie de développement. Il est estimé que 2,4 millions de nouveau cas apparaissent par an, dont environ 50% des cas touchent des enfants et des adolescents (WHO, 2012).

Plusieurs étiologies sont associées à l'épilepsie, dont des lésions cérébrales provenant d'un traumatisme périnatal, des infections telles que la méningite ou l'encéphalite, des maladies vasculaires, des maladies neurodégénératives, des tumeurs, l'abus d'alcool, quelques drogues ou substances toxiques, mais il existe aussi des épilepsies ayant des causes génétiques et d'autres dont la cause n'est pas encore connue (Berg et al., 2010). Les signes et les symptômes des épilepsies sont aussi assez variés, et la classification va dépendre des régions cérébrales initialement affectées, ainsi que de l'apparition ou non d'une généralisation de la crise. Ces crises peuvent également être distinguées selon qu'elles soient focales, quand elles démarrent dans un des hémisphères, ou généralisées, quand elles apparaissent dans les deux hémisphères cérébraux (Berg et al., 2010). Au vu des multiples manifestations de cette maladie, parler des épilepsies, en insistant sur le pluriel, serait donc plus adéquat pour la définir.

Les crises épileptiques, focales ou généralisées, sont définies comme étant des manifestations cliniques causées par une décharge transitoire, excessive et anormale des

cellules du système nerveux central, pouvant être une activité focale ou généralisée (Fisher et al., 2005). Les crises épileptiques, à leur tour, sont définies comme étant une manifestation clinique causée par des décharges transitoires, excessives et anormales des cellules du système nerveux central, qui peut être une activité focale ou généralisée (Fisher et al., 2005).

Vue que la définition conceptuelle n'est pas facilement applicable dans la pratique clinique, la ligue internationale contre les épilepsies (International League Against Epilepsy - ILAE) a proposé une définition opérationnelle, qui décrit l'épilepsie comme étant une maladie cérébrale caractérisée par une des conditions suivantes :

- 1) Occurrence d'au moins deux crises non provoquées (ou réflexes) qui surviennent avec un délai d'au moins 24 heures ;
- 2) Présence d'une crise non provoquée (ou réflexe) associée à une probabilité de 60 % de refaire des crises similaires avec un risque de récurrence générale au cours des 10 années suivantes ;
- 3) Le diagnostic d'un syndrome épileptique (Fisher et al., 2014).

Les crises épileptiques sont classées comme partielles ou généralisées. En 2010, la commission de classification et terminologie de l'ILAE a publié une révision dans laquelle le terme « partielle » a été remplacé par « focale » pour les crises qui débutent au sein d'un réseau neuronal limité à un hémisphère cérébral. Dès lors qu'elles trouvent leur origine au sein d'un réseau cortical ou sous-cortical distribué dans les deux hémisphères, sans avoir un foyer spécifique et sans nécessairement affecter tout le cortex cérébral, les crises sont considérées comme généralisées (Berg et al., 2010; Moshé et al., 2015). Cette distinction est extrêmement importante non seulement pour déterminer si l'épilepsie résulte d'une pathologie focale, mais aussi dans le choix de la région devant être chirurgicalement retirée (révision (Moshé et al., 2015).

## 1.2. L'ÉPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL (ELT)

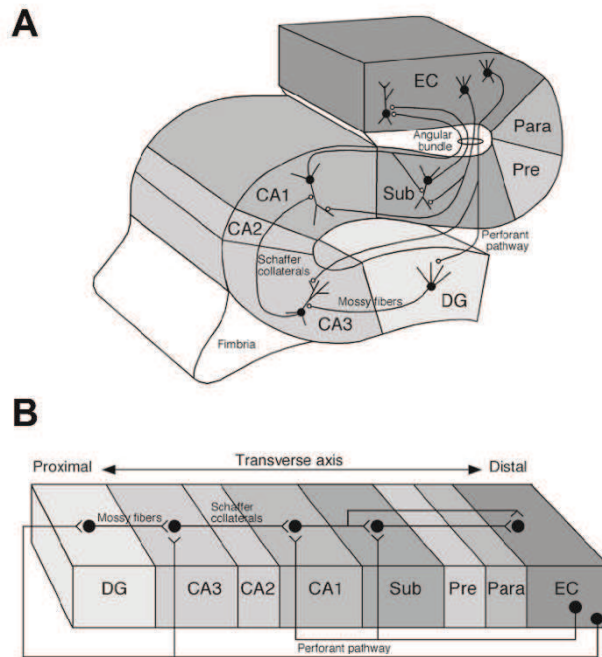
L'épilepsie du lobe temporele (ELT) est la forme la plus typique entre les épilepsies. Elle touche environ 40% des patients (Engel, 2001). L'ELT est une forme sévère et invalidante d'épilepsie, et approximativement 30 % des patients présentent des crises réfractaires au traitement pharmacologique (Engel, 1996; Kwan et Brodie, 2000; Litt et al., 2001; McKeown et McNamara, 2001). L'ELT touche principalement des régions localisées dans le lobe temporal, et l'hippocampe est la structure la plus touchée. La physiopathologie de l'ELT est déjà bien connue dans la littérature scientifique, mais avant de passer à ce sujet, nous allons faire une brève révision de la cytoarchitecture et des interconnexions liées à la circuiterie des crises.

### 1.2.1. Le lobe temporal

#### 1.2.1.1. *L'hippocampe*

Le lobe temporal se trouve dans la partie inférieure de l'encéphale, sous les lobules frontal et pariétal, jusqu'à la scissure de Sylvius. Le lobe temporal inclut le cortex temporal, qui est divisé en 5 gyri – supérieur, médial, inférieur, fusiforme et parahippocampique – le subiculum, l'hippocampe et l'amygdale.

L'hippocampe proprement dit est sous-divisé en trois régions appelées cornu ammonis 1 (CA1), CA2 et CA3. Et la formation hippocampique inclut les trois sous-régions CA's, le gyrus denté (GD), le subiculum et le cortex entorhinal (**Figure 1** – Extrait du livre "The Hippocampus" ; Andersen et al., 2006).



**Figure 1** : Présentation schématique de la formation hippocampique et de la connexion tri-synaptique (The hippocampus book)

La formation hippocampique présente une connectivité unidirectionnelle, dont la principale afférence vient du cortex entorhinal vers le DG et CA3 par la voie perforante, mais aussi vers le subiculum et le CA1. Les cellules granulaires du DG projettent par la suite vers la couche CA3 (les axones sont appelés fibres moussues). De CA3 partent les collatérales de Schaffer vers CA1. Finalement, la couche CA1 envoie des projections vers le subiculum ou encore des projections directes vers le cortex entorhinal, qui reçoit aussi des projections venant du subiculum. Ainsi, le cortex entorhinal peut être considéré comme étant la principale entrée d'afférences, mais aussi le principal point de sortie des informations venues de la formation hippocampique (**Figure 1** ; Andersen et al., 2006)

### 1.2.1.2. *Le cortex entorhinal*

Le cortex entorhinal, aussi appelé l'aire 28 de Brodmann, est localisé dans la partie médiane du lobe temporal. Il est longé par la scissure rhinale, ce qui explique son nom. Il

est la principale structure d'interface entre l'hippocampe et plusieurs régions corticales associatives multimodales, localisées dans les cortex pariétal, temporal et préfrontal (Canto et al., 2008). Comme l'hippocampe, le cortex entorhinal est très étudié dans le contexte de la mémoire et de la navigation spatiale (Jacobs et al., 2010). L'intérêt pour ce cortex remonte au 19<sup>e</sup> siècle, quand Ramòn Y Cajal posait les bases de sa théorie neuronale et était frappé par la densité des projections vers la formation hippocampique, « la voie perforante » (Canto et al., 2008). De façon très succincte, les couches les plus superficielles (II et III) du cortex entorhinal reçoivent des afférences de structures corticales associatives. La couche II, envoie des projections directes vers le GD et CA3 (voie perforante), et la couche III projette directement vers CA1 et le subiculum. Dans l'autre sens, donc depuis la formation hippocampique, partent des afférences en provenance du subiculum et de CA1 et à destination de la couche V du cortex entorhinal (Canto et al., 2008).

#### ***1.2.1.3. Le cortex piriforme***

Le cortex piriforme, aussi appelé cortex olfactif, est localisé entre les noyaux olfactifs antérieurs, le cortex periamygdaloïde et le cortex entorhinal, dans la scissure rhinale. Le cortex piriforme est formé de trois couches (I, II et III). La couche II est considérée comme la principale porte d'entrée d'informations du cortex piriforme et est constituée principalement par des neurones glutamatergiques semi-lunaires et des neurones pyramidaux spinaux (Giessel et Datta, 2014; Suzuki et Bekkers, 2011), ainsi que par des interneurons GABAergiques (Giessel et Datta, 2014). La plus grande partie des afférences du cortex piriforme viennent du bulbe olfactif. Néanmoins, il existe également des projections venant du prosencéphale, du thalamus, de l'hypothalamus et du tronc cérébral (Löscher et Ebert, 1996). Le cortex piriforme reçoit également des

projections monoaminergiques, puisqu'il existe une voie sérotoninergique provenant des noyaux du raphé (Gellman et Aghajanian, 1993, 1994; Muller et Jacobs, 2009; Sheldon et Aghajanian, 1990, 1991), noradrénergique en provenance du locus cœruleus (Aston-Jones et al., 1996; Haberly et Price, 1978), et dopaminergique venant de l'aire tegmentale ventrale (Haberly et Price, 1978; Loughlin et Fallon, 1984). Ces projections monoaminergiques innervent les interneurons GABAergiques du cortex piriforme, permettant ainsi une modulation de l'activité des neurones pyramidaux. Parmi les projections efférentes, les neurones pyramidaux du cortex piriforme projettent vers plusieurs noyaux amygdaliens, mais aussi vers le cortex insulaire, entorhinal, le subiculum et les noyaux médiodorsal du thalamus (Courtiol et Wilson, 2013; Löscher et Ebert, 1996). De plus, le cortex piriforme présente une connectivité intrinsèque combinant des influences excitatrices et inhibitrices (Löscher et Ebert, 1996).

#### ***1.2.1.4. L'Amygdale***

Décrite pour la première fois au 19<sup>e</sup> siècle par Burdach (1819), l'amygdale est un groupement neuronal en forme d'amande, d'où son nom (amygdale en latin signifie amande). Chez l'Homme, l'amygdale mesure environ 2 cm et est située dans la partie médiane du lobe temporal. Burdach a décrit le noyau basolatéral de l'amygdale (BLA). Avec le temps, d'autres noyaux ont été identifiés autour du BLA. Cette structure est aussi nommée complexe amygdalien, car elle est formée par environ 10 noyaux (Sah et al., 2003). Ces différents noyaux amygdaliens peuvent se distinguer sur des bases neuroanatomiques ou en fonctions de leur connectivité. Par le fait que l'amygdale possède tant de connexions intra- comme inter-noyaux, mais aussi du fait qu'elle a des afférences et efférences vers des régions corticales et sous-corticales (Sah et al., 2003), elle est considérée comme une structure complexe du point de vue de sa connectivité. Elle est



associée à des fonctions liées à des émotions telles que l'anxiété, la peur, mais aussi au comportement sexuel et à l'agressivité. Pour cette raison, mais aussi du fait de ses connexions avec l'hippocampe, le thalamus, le cortex préfrontal et les noyaux septaux, l'amygdale est considérée comme une structure appartenant au système limbique.

#### **1.2.1.5. *Le thalamus***

Le thalamus est aussi une structure complexe, située dans le diencephale et composée d'une cinquantaine de noyaux. Cependant, il peut être divisé en quatre parties principales : l'hypothalamus, l'épithalamus, le périthalamus (ou thalamus ventral) et le thalamus dorsal (Herrero et al., 2002). Les noyaux thalamiques ont des projections bien spécifiques vers des régions corticales, qui reçoivent des projections en provenance d'un unique noyau thalamique et projettent en retour vers d'autres noyaux thalamiques (Herrero et al., 2002). Ainsi, le thalamus a un important rôle comme noyaux relais dans le traitement des informations sensorielles et motrices.

Les noyaux de la ligne médiane du thalamus tels que le reuniens, le rhomboïde et le médiodorsal, envoient des projections vers la formation hippocampique, le cortex piriforme et le cortex préfrontal (Van der Werf et al., 2002). Le noyau reuniens projette aussi vers les noyaux médiodorsal, rhomboïde et réticulaire du thalamus (Van der Werf et al., 2002). Il existe aussi une connexion réciproque entre le noyau reuniens et CA1, où le noyau reuniens projette vers des neurones glutamatergiques (Herkenham, 1978), mais aussi GABAergiques (Dolleman-Van der Weel et Witter, 2000) ayant ainsi un rôle modulateur de l'activité hippocampique à travers des mécanismes excitateurs et inhibiteurs. En raison de la connectivité du reuniens avec l'hippocampe et le cortex préfrontal, il agit comme une sorte de « hub » entre ces régions, et joue un rôle important dans les fonctions cognitives telles que l'apprentissage et la mémoire (Cassel et al., 2013).

Le noyau rhomboïde, a aussi des projections vers le cortex moteur (Vertes et al., 2006; Van der Werf et al., 2002).

Le noyau médiodorsal reçoit des informations de l'amygdale, des cortex entorhinal et piriforme, et envoie des projections vers le cortex préfrontal (Mitchell et Chakraborty, 2013; Ray et Price, 1992). Bay et Cavdar (2013) ont démontré que le noyau médiodorsal possède trois sous-noyaux, chacun avec une connectivité distincte. La principale voie d'entrée de la portion médiane (MDm) vient du cortex piriforme, la région centrale (MDc) reçoit des connexions en provenance principalement des régions limbiques, et la partie latérale (MDl) est innervée par le cortex moteur (Bay et Cavdar, 2013). De plus, Bay et Cavdar (2013) ont également démontré que les sous-noyaux MDm et MDc peuvent être considérés comme étant des structures « d'ordre supérieur », car ce sont des structures qui reçoivent aussi des projections excitatrices aussi bien directrices (« driver ») que modulatrices. Le sous-noyau MDl est considéré comme étant une région de « premier ordre », notamment du fait de ses afférences uniquement modulateurs (Bay et Cavdar, 2013).

Des études de connectivité chez des macaques ont démontré que les noyaux médiodorsal et latérodorsal du thalamus, ainsi que les noyaux antérieurs, sont liés à des processus cognitifs tels que la mémoire et le traitement d'informations spatiales (Aggleton et al., 2014). Le noyau médiodorsal reçoit très peu d'afférences venues du cortex cingulaire, tandis que le noyau latérodorsal reçoit des projections denses venant des cortex cingulaire et retrosplénial (Aggleton et al., 2014). De plus, le noyau latérodorsal a des projections réciproques avec la formation hippocampique (Aggleton et al., 1986).

Le cortex retrosplénial est une région jouant un rôle important dans la mémoire de type épisodique (Valenstein et al., 1987; Vann et al., 2009). Le noyau latérodorsal,

avec les noyaux antérieurs du thalamus, possèdent des cellules de direction de la tête (de l'anglais *Head-direction cells*), qui sont activées quand la tête de l'animal se tourne vers une direction spécifique (Mizumori et Williams, 1993; Taube, 2007). Parce que les cellules de direction de la tête sont aussi trouvées dans le cortex retrosplénial, mais aussi au vu des connexions existantes entre le cortex retrosplénial et ces noyaux thalamiques, ce sont des régions très étudiées pour leur importance dans l'apprentissage et le traitement d'informations spatiales et de navigation (Cooper et al., 2001; Sutherland et al., 1993).

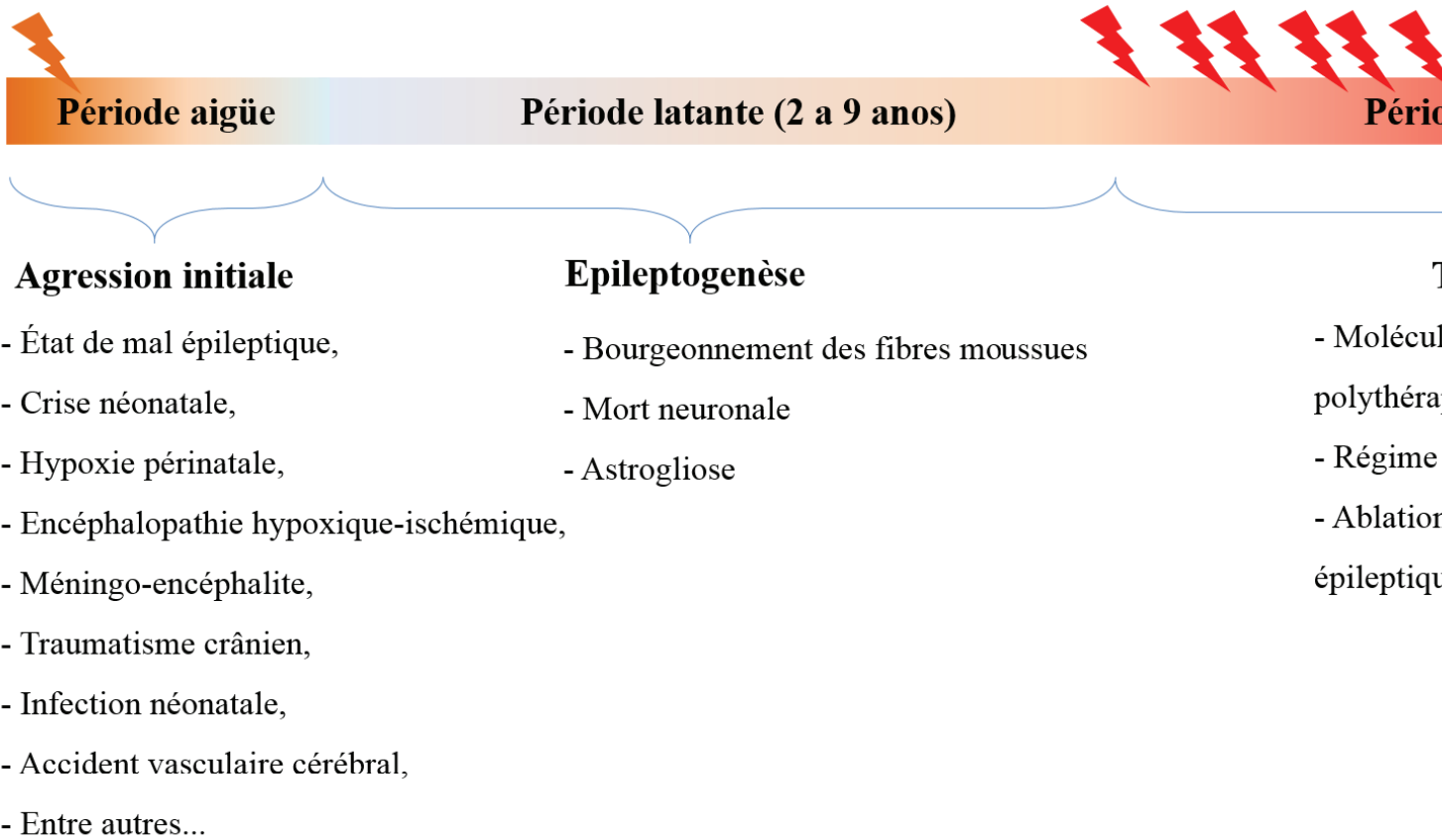
Le noyau réticulaire thalamique (NRT), décrit pour la première fois par Kölliker e 1896, est le noyau qui possède la plus grande densité de neurones GABAergiques du thalamus. La connectivité réciproque existant entre les noyaux thalamiques et le cortex est principalement de nature excitatrice et traverse le NRT. En contrepartie, les neurones du NRT envoient des projections inhibitrices vers d'autres noyaux thalamiques, permettant ainsi un contrôle fin des connexions thalamo-corticales (Jones, 1975; Pinault, 2004). De plus, le NRT envoie également des projections vers l'hippocampe (Dolleman-Van der Weel et Witter, 2000) et reçoit à son tour des informations de l'hippocampe via le subiculum (Witter et Groenewegen, 1990). Le NRT envoie aussi des projections vers le cortex périrhinal comme vers le cortex moteur (Vertes et al., 2006). Il est intéressant de noter que le NRT a aussi des projections vers toutes les sous-régions du noyau médiodorsal (Bay et Cavdar, 2013).

### **1.2.2. Etiologie de l'ELT**

L'ELT est classifiée comme une forme d'épilepsie « symptomatique du lobe temporal ». L'étiologie de l'ELT est assez variée d'un cas à l'autre. Mais de façon générale, l'ELT est générée par des facteurs précipitants tels qu'un status epilepticus (SE) fébrile ou non, des crises néonatales, une hypoxie périnatale, une encéphalopathie

hypoxique-ischémique, une méningoencéphalite, un traumatisme crânien, une infection néonatale, un accident vasculaire cérébral, entre autres causes possibles (Shukla et Prasad, 2012). Cependant, ce ne sont pas toutes les personnes ayant été exposées à un de ces facteurs qui vont développer une ELT. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'il est très difficile de diagnostiquer l'ELT de façon précoce, car le diagnostic est fait seulement avec l'apparition des crises spontanées récurrentes. Et c'est seulement à ce moment qu'il est possible de commencer un traitement pharmacologique. Il y a un décalage temporel de quelques années entre l'atteinte initiale et l'apparition des crises spontanées récurrentes. Ce délai variera en fonction de la nature de l'atteinte initiale. L'intervalle entre l'atteinte initiale et l'apparition des crises est nommé période latente. Il s'agit d'une période critique pour la formation du circuit épileptique. C'est d'ailleurs pour cette raison que l'intérêt de la communauté scientifique actuelle à étudier les altérations morphologiques et biochimiques qui surviennent dans le système nerveux central pendant cette période de latence va crescendo. En dépend notamment la mise en évidence de mécanismes qui permettraient une intervention qui permettrait de prévenir le développement du circuit anormal (**Figure 2**).

## Chronologie de l'ELT humaine (Shukla)



**Figure 2:** Chronologie de l'ELT humaine.

### **1.2.3. Epileptogenèse**

La période latente observée entre l'événement initial et l'apparition des premières crises convulsives peut varier de 2 à 9 ans (French et al., 1993; Shukla et Prasad, 2012). Comme dit précédemment, c'est dans cette période que des altérations morphologiques, neurochimiques et moléculaires ont lieu, et ce sont ces altérations qui vont aboutir à la formation d'un circuit anormal, les neurones survivants générant des décharges épileptiformes synchrones et récurrentes (Sloviter et Bumanglag, 2013).

Chez les patients avec une ELT comme dans les modèles animaux, la genèse du circuit épileptique est un processus dynamique qui va aboutir à la formation d'un focus épileptique. La période peut être de quelques années chez l'Homme, mais seulement de quelques jours dans un modèle animal. Dans le modèle d'ELT induit par la pilocarpine, par exemple, la période de latence est de 14 à 48 jours (Leite et al., 1990).

Il est extrêmement important de déterminer la fenêtre temporelle dans laquelle se forme le circuit épileptique dans des modèles animaux, pour dégager des informations cruciales susceptibles d'éclairer les interventions cliniques. Sloviter et Bumanglag (2013) ont suggéré que l'épileptogenèse proprement dite se passe seulement au cours des sept premiers jours après l'atteinte initiale, après quoi s'installe une période de maturation du circuit épileptique. Ensuite la période chronique est marquée par l'apparition des crises spontanées récurrentes, et, chez l'Homme, c'est à ce moment que commence la tentative de traitement pharmacologique des crises.

### **1.2.4. La physiopathologie de l'ELT**

La sclérose hippocampique (SH) est la caractéristique histopathologique la plus fréquente dans l'ELT. On la retrouve chez à peu près 65 % des patients présentant des

crises résistantes au traitement pharmacologique (Babb et al., 1984; Blumcke et al., 2013; Sommer, 1880). La SH est caractérisée par une perte des neurones pyramidaux, principalement dans les sous-régions de CA1, CA3, mais aussi dans le hile du GD et dans le prosubiculum. Cette perte est accompagnée par une réorganisation synaptique à partir du bourgeonnement des fibres mossues, et par une dispersion des neurones granulaires du GD (Babb et al., 1991; Houser et al., 1990; Mathern et al., 1995). Au-delà de la formation hippocampique, d'autres régions sont affectées, dont le cortex entorhinal (Kasper et al., 1999).

#### **1.2.5. Altérations neurochimiques de l'ELT**

En plus des altérations morphologiques et de la connectivité observée dans l'ELT, des altérations neurochimiques sont également très fréquemment observées. La littérature montre un déséquilibre entre la neurotransmission excitatrice et inhibitrice dans l'hippocampe de patients atteints d'ELT. C'est aussi le cas dans des modèles animaux. Ces altérations consistent principalement en une augmentation du glutamate et de l'aspartate, mais aussi en une réduction du GABA. Ces modifications sont détectées environ 5 heures après le début d'un SE induit par la pilocarpine (Fernandes et al., 1994; Cavalheiro et al., 1994). Dans la période latente la concentration de glutamate est augmentée et celle de la glycine et du GABA est diminuée. Finalement, dans la période chronique on observe une augmentation de l'aspartate, du glutamate, de la glycine, de la glutamine et du GABA (Fernandes et al., 1994; Cavalheiro et al., 1994).

L'inhibition anormale des neurones GABAergiques au niveau de CA1 provoque une synchronisation anormale qui aboutira à l'apparition des crises (Wittner et al., 2002). On a également observé une augmentation de l'expression du récepteur glutamatergique

GluR1 dans les fibres moussues, dans le hile du GD, ainsi que dans les cellules pyramidales de CA3 (Eid et al., 2002). Le GABA, la glycine et la taurine sont connus pour avoir des effets inhibiteurs dans le système nerveux. En contrepartie, aussi bien le glutamate que l'aspartate sont des ligands endogènes des récepteurs excitateurs (Wagner et al., 1991).

Une réduction de la concentration de noradrénaline, accompagnée d'une augmentation de son turnover ont été décrites dans des modèles expérimentaux d'ELT (Fernandes et al. 1994; Cavalheiro et al., 1994; Freitas et al., 2010; Pires et al., 2015). Au contraire, pour la dopamine, c'est une augmentation de concentration et une réduction du turnover qu'on retrouve dans les trois périodes du modèle (Fernandes et al. 1994; Cavalheiro et al., 1994). Une augmentation de la concentration de sérotonine n'a été trouvée que dans la période aiguë, mais une augmentation du turnover de la sérotonine a été observée dans la période latente alors qu'aucun changement n'a été observé dans la phase chronique (Fernandes et al. 1994; Cavalheiro et al., 1994).

En plus des altérations des monoamines et des acides aminés, d'autres systèmes de neurotransmission sont altérés dans des tissus épileptiques. Nous observons des altérations des opioïdes, de la biochimie purinergique, des canaux ioniques tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Cl}^-$  couplé au GABA et de l'activité de l'enzyme  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (Fernandes et al. 1994).

Le système purinergique a été très étudié au cours des dernières années, vu qu'il possède une activité modulatrice de nature inhibitrice, à travers l'adénosine, mais excitatrice à travers l'ATP et son produit d'hydrolyse, l'ADP (Ralevic et Burnstock, 1998). Une augmentation de l'expression des récepteurs purinergiques P2X7 a été observée dans la phase aiguë et chronique du modèle de la pilocarpine, principalement dans les cellules de CA1 et CA3, mais aussi dans les astrocytes et les cellules microgliales



pendant la phase aiguë (Doná et al., 2009). Et augmenté dans le hile du GD, et en CA3, ayant peu d'expression dans les cellules gliales dans la phase chronique (Doná et al., 2009; Vianna et al., 2002). Cette expression différentielle des récepteurs P2X7 dans l'hippocampe des rats, dans les différentes périodes du modèle de la pilocarpine, suggère des rôles différents pour ces récepteurs. Selon les auteurs, dans la période aiguë les modifications au niveau des récepteurs seraient liées à des processus inflammatoires dus aux crises, tandis que, dans la période chronique, ils seraient liés à des processus d'excitabilité (Doná et al., 2009).

Des travaux ont montré une participation des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases dans le processus d'excitabilité induit par les crises (Fernandes et al., 1996; de Lores Arnaiz et Ordieres, 2014; Reime Kinjo et al., 2007). L'activité des ATPases est augmentée dans l'hippocampe des rats soumis au modèle de la pilocarpine, et ce pendant les périodes aiguë et latente, et réduits pendant la période chronique, suggérant un rôle de cette enzyme dans l'apparition des crises limbiques (Fernandes et al., 1996).

### **1.2.6. Modèle d'épilepsie lésionnel induite par la pilocarpine**

Le modèle d'épilepsie induite par la pilocarpine chez les rats reproduit les principales caractéristiques physiopathologiques de l'ELT humaine (Cavalheiro, 1995; Turski et al., 1983). La pilocarpine est une substance alcaloïde extraite de la plante *Pilocarpus jaborandi*. Il s'agit d'un agoniste des récepteurs cholinergiques de type muscarinique M1 dans le cerveau des mammifères (Turski et al., 1983). Des doses élevées de pilocarpine (300-380 mg/kg) injectées par voie systémique induisent des crises limbiques ainsi qu'un SE pouvant durer jusqu'à 12 heures. L'administration de chlorure de lithium (127,12 mg/kg), de 16 à 20 heures avant l'injection de la pilocarpine, potentialise les effets de cette drogue, permettant une réduction de la dose nécessaire pour

induire le SE (on passe ainsi de 380 mg/kg à 30 mg/kg). Dans les deux modèles (pilocarpine et lithium/pilocarpine – Li-Pilo), on retrouve des conséquences similaires au plan cérébral, à savoir une sclérose hippocampique, une mort cellulaire dans des régions extra-hippocampiques (cortex entorhinal, cortex piriforme, thalamus complexe amygdalien et substance noire), un bourgeonnement des fibres moussues et une gliose (Cavalheiro, 1995; Leite et al., 1990).

Le processus épileptogène dans le modèle de la pilocarpine démarre par l'induction du SE. La période aiguë correspond aux 24 premières heures. Elle est suivie par une période latente, caractérisée par une absence de crises, dont la durée peut varier de 7 à 44 jours (Leite et al., 1990). La **Figure 3** montre l'évolution temporelle des altérations qui ont lieu dans le modèle de la pilocarpine. Celles-ci sont similaires lorsque la pilocarpine est associée au lithium.

# Modèle pilocarpine associé au Lithium

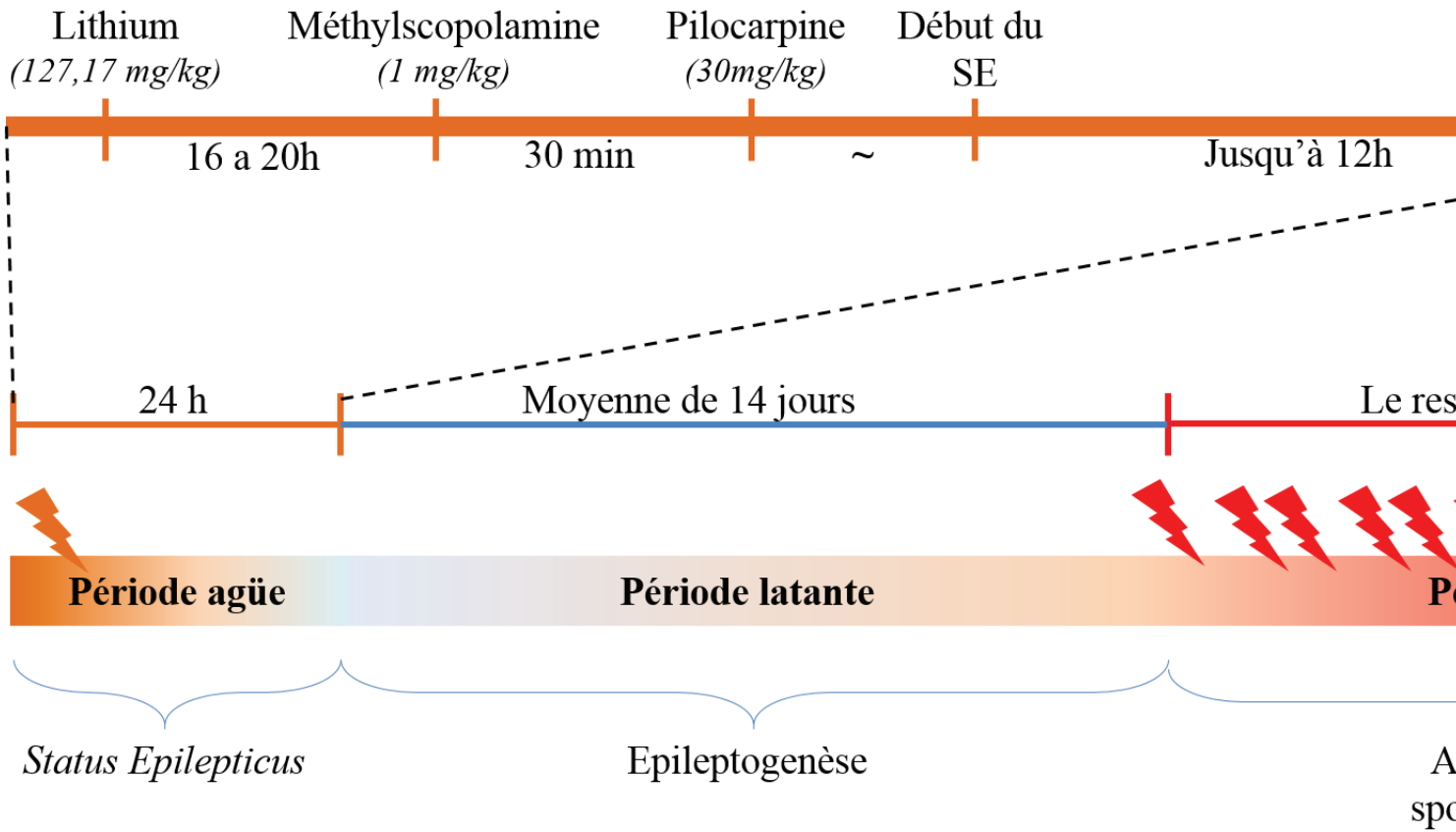


Figure 3: Modèle de la pilocarpina (d'après Cavalheiro et al., 1983; et Leite et al., 1990)

### **1.2.7. Stratégies de neuroprotection**

Les médicaments antiépileptiques (MAE) sont aujourd'hui la forme la plus courante de traitement des patients épileptiques (Perucca, 2005). Cependant, dans plusieurs cas, l'administration d'une MAE n'est pas suffisante pour contrôler les crises, nécessitant la mise en œuvre d'une polythérapie (association de deux MAE, voire davantage) (Perucca, 2005). Il existe actuellement de nombreux MAE disponibles sur le marché. On estime qu'environ 30 % des patients souffrant d'une ELT présentent des crises réfractaires au traitement pharmacologique (Kwan et Brodie, 2000). Dans ce cas, l'ablation chirurgicale partielle ou totale de l'hippocampe et d'autres régions comme l'amygdale et le cortex temporal est l'unique solution pour le contrôle des crises. Après l'ablation chirurgicale du foyer épileptique, entre 60 et 80 % des patients restent libres de crises pour une période d'environ 2 ans (Arruda et al., 1996; Bien et al., 2001; Engel Jr. et al., 1993; Janszky et al., 2005; von Lehe et al., 2006; Wiebe et al., 2001; Wieser et Häne, 2003).

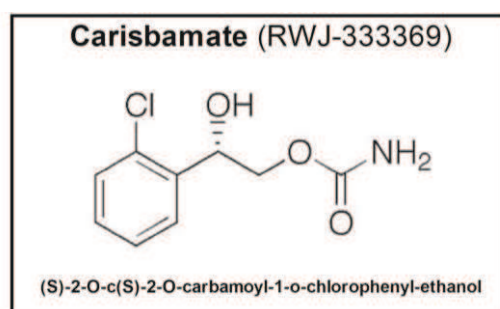
L'élaboration de stratégies de neuroprotection capables de modifier le processus épileptogène apparaît souhaitable pour les patients risquant de développer une ELT. Des études ont montré que le traitement avec des MAE peut promouvoir une neuroprotection significative, mais il reste à savoir si cette neuroprotection est capable d'avoir un impact sur le plan des crises elles-mêmes, tant au plan quantitatif (par ex., nombre de crises) que qualitatif (par ex., nature et sévérité des crises). Dans les dernières années, plusieurs groupes ont essayé d'élucider le rôle neuroprotecteur de certains médicaments ayant une action antiépileptique comme, par exemple, le vigabatrin (André et al., 2001), le prégabaline (André et al., 2003), le topiramate en monothérapie (Rigoulot et al., 2004) ou associé au diazepam (DZP) (François et al., 2006). En majorité, ces MAE ont été testés après le début du SE (30-60 min) et, généralement, le traitement a été maintenu pendant

environ une semaine sur la base d'une administration quotidienne. Toutefois, même quand une neuroprotection significative a été constatée, aucun des MAE n'a été capable de prévenir ou d'altérer l'épileptogenèse (André et al., 2001, 2003; François et al., 2006; Rigoulot et al., 2004).

Un MAE potentiel, non disponible dans le marché des médicaments destinés à l'Homme, a fait l'objet d'une attention particulière, autant pour sa capacité à promouvoir une neuroprotection significative, que pour son effet modificateur potentiel de l'épileptogenèse dans le modèle de la pilocarpine. Il s'agit du carisbamate.

### 1.3. CARISBAMATE

Le carisbamate (CRS ; RWJ-333369; S-2-O-carbamoyl-1-o-chlorophenyl-ethanol) (**Figure 4**) est un neuromodulateur initialement développé par SK Biopharmaceuticals. Il a été étudié pour le traitement de crises partielles. Il a une certaine similarité avec le felbamate, avec ses seulement deux carbones au niveau de sa chaîne latérale et son groupe carbamate unique ; en conséquence, il produit l'aldéhyde  $\alpha,\beta$  insaturé, un métabolite similaire à celui produit par le felbamate (Thompson et al., 1996).



**Figure 4** : Structure moléculaire du Carisbamate (CRS ; RWJ-333369 ; S-2-O-carbamoyl-1-o-chlorophenyl-ethanol)

### 1.3.1. Essais précliniques

Des études in-vitro ont démontré que le carisbamate est capable de bloquer des événements épileptiformes spontanés et récurrents (EESR) dans des cultures de cellules neuronales hippocampiques, en plus de réduire la fréquence des potentiels d'action (Deshpande et al., 2008a, 2008b). Dans cette étude, le SE a été modélisé par une exposition des cultures cellulaires à un milieu contenant une concentration réduite en  $Mg^{2+}$  pendant 3 heures. Après ces trois heures, le réseau neuronal manifeste des EESR qui se maintiennent pendant toute la survie de l'échantillon en culture. L'exposition des cultures à du carisbamate pendant 12 heures a empêché l'apparition des EESR dans presque tous les neurones (Deshpande et al., 2008b). Qui plus est, dans les rares neurones ayant présenté des EESR, ces derniers étaient significativement réduits en termes de fréquence et de durée.

Dans des modèles animaux, l'administration de carisbamate par voie orale est caractérisée par une quasi-complète absorption, par un métabolisme prolongé et par une voie d'excrétion principalement rénale (Mamidi et al., 2007).

Des études précliniques ont montré un vaste spectre d'activité anticonvulsivante du carisbamate (Novak et al., 2007). Dans le modèle animal d'épilepsie absence GAERS (pour Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg), le traitement par du carisbamate a promu une réduction significative des décharges de point-ondes (DPOs), principales caractéristiques électroencéphalographique de l'épilepsie absence (François et al., 2008). Dans la même étude, le traitement par le carisbamate a aussi bloqué complètement les crises toniques chez les rats Wistar qui présentent des crises audiogènes (WAS– pour Wistar Audiogenic Sensitive, François et al., 2008). De manière similaire, le traitement par le carisbamate s'est montré efficace dans le modèle d'ELT induit par injection d'acide kaïnique, en réduisant la fréquence des crises de façon dose-dépendante (Grabenstatter et

Dudek, 2008). Dans le modèle Li-Pilo d'ELT, le carisbamate a augmenté significativement la latence d'apparition des crises spontanées et, de façon dose-dépendante, a induit une modification de l'expression des crises chez environ 45 % des animaux traités. En effet, ces animaux n'ont pas développé de crises limbique mais des crises d'absence (François et al., 2011). L'étude faite par François et collaborateurs (2011) a enregistré les DPOs bilatéralement dans le cortex préfrontal mais pas dans des régions limbiques telles que l'hippocampe et le cortex entorhinal. Ces décharges étaient réduites par l'administration d'ethosuximide, de trimétadione et même avec le carisbamate, et étaient aggravées suite à une administration de carbamazépine. Les effets de toutes ces drogues étaient similaires à ceux observés quand ces mêmes substances sont administrées dans le cadre de modèles d'épilepsie absence ainsi que chez les patients souffrant de cette épilepsie (Danover et al., 1998; François et al., 2008, 2011). En plus des altérations électroencéphalographiques, le carisbamate a induit une neuroprotection dose-dépendante dans la région CA1 de l'hippocampe, le cortex piriforme ventral et dorsal, le cortex entorhinal, ainsi que dans des noyaux thalamiques et amygdaliens des rats soumis au traitement Li-Pilo (François et al., 2011). Seul le hile du GD n'a pas présenté de neuroprotection après l'administration de carisbamate.

Il est important de souligner que dans une étude récente, réalisée au sein de notre équipe, une vaste évaluation comportementale a été réalisée chez des rats Li-Pilo traités par du carisbamate (Faure et al., 2013, 2014). Nous avons démontré que, chez une partie des rats développant une épilepsie absence (environ 50 %), le carisbamate est capable de préserver les fonctions cognitivo-comportementales affectées par le développement d'une épilepsie de type ELT (apprentissage, mémoire procédurale, mémoire de référence, anxiété, locomotion, coordination, attention et des comportements impulsifs et compulsifs). Ainsi, les animaux traités par le carisbamate et qui ont développé des crises

convulsives récurrentes spontanées ont présenté une augmentation de l'activité locomotrice basale, une diminution du comportement exploratoire, des déficits généralisés dans la mise en œuvre des différents types de mémoire évoqués ci-dessus. Ces déficits étaient similaires à ceux observés chez les rats soumis au modèle Li-Pilo mais non traités par le carisbamate (Faure et al., 2013). De plus, les animaux ont présenté également une attention visuelle soutenue réduite et une augmentation des comportements impulsifs et compulsifs (Faure et al., 2014).

### **1.3.2. Essais cliniques**

Après d'intéressants résultats obtenus avec les essais précliniques, le carisbamate a obtenu l'autorisation pour une application dans le cadre d'essais cliniques. Ces essais ont été divisés en 5 phases (de 0 à 4) :

Phase 0: Etude de la pharmacodynamique et pharmacocinétique du carisbamate;

Phase 1: Confiance et sécurité chez des individus sains;

Phase 2: Établissement de la dose thérapeutique efficace;

Phase 3: Confirmation de la sécurité, efficacité et significativité statistique ;

Phase 4: Description des cas d'effets indésirables et description du protocole d'utilisation du médicament ;

Dans la phase 0 des essais cliniques, l'administration du carisbamate chez l'Homme a montré une absorption complète, une large glucuronidation, de même que l'hydrolyse du carbamate. L'excrétion de la substance dans sa forme inchangée ainsi que celle de ses métabolites s'est faite quasi totalement par voie urinaire (Mannens et al., 2007). Le carisbamate est métabolisé principalement par l'enzyme uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT), et le principal métabolite qui en résulte est le carisbamate-glucuronide (Chien et al., 2006). Les études ont montré que le carisbamate



possède une pharmacocinétique linéaire et que cette dernière n'est pas altérée par l'alimentation (Yao et al., 2006) ni par l'âge (Levy et al., 2008).

Les essais cliniques de phase I ont montré que les effets secondaires les plus courants dus à l'utilisation du carisbamate sont des vertiges, des nausées et une somnolence (Faught et al., 2008; Sperling et al., 2010; Trenité et al., 2007). De plus, Meador et collaborateurs (2011) ont effectué une évaluation cognitive chez des individus sains sans observer d'altérations cognitives jusqu'à des doses de 500 mg/jour. Avec des doses de 1000 et 1500 mg/jour, des altérations légères et modérées du temps de réaction, de la vigilance et de quelques processus mnémoniques ont été détectés (Meador et al., 2011).

Dans les essais cliniques de phase II, l'administration de 300 mg de carbamazépine (une MAE qui induit aussi l'UGT) en même temps que celle de carisbamate (250 et 500 mg, deux fois par jour) a réduit de façon significative la demi-vie du carisbamate (environ 60 % - Chien et al., 2006). De plus, l'administration du carisbamate associé au valproate ou à la lamotrigine s'est avérée être sûre et bien tolérée (Chien et al., 2007). En outre, l'administration du carisbamate de façon concomitante avec du valproate ou la lamotrigine chez des patients avec photosensibilité a réduit de façon dose-dépendante la sensibilité à la lumière et a présenté une bonne tolérance (Trenité et al., 2007). Dans un autre essai clinique effectué par Faught et collaborateur (2008), le carisbamate, quand il était administré en co-thérapie avec le valproate, s'est montré efficace en réduisant la fréquence des crises partielles, aux doses de 300, 800 et 1600 mg/jour.

Les études de phase III n'ont pas débouché sur des résultats concluants. Sperling et collaborateurs (2010) ont réalisé deux études en double-aveugle randomisé, en utilisant une dose de carisbamate de 400 mg/jour dans l'une et une dose de 200 mg/jour dans

l'autre. A la dose de 400 mg/jour, le carisbamate a produit des effets positifs chez des patients souffrant de crises partielles réfractaires. Cet effet n'a pas été observé à la dose de 200 mg/jour (Sperling et al., 2010). Dans l'étude effectuée par Halford et collaborateurs (2011) chez des patients souffrant de crises partielles, aucune différence n'a été observée entre les patients traités par le carisbamate et ceux traités avec le placebo.

Bien que le traitement par le carisbamate ait débouché sur des résultats encourageants, non seulement dans les recherches précliniques (menées sur des modèles animaux), mais aussi dans les phases 0, I et II des essais cliniques (Bialer et al., 2009), la NDA (New Drug Application) et la MAA (Marketing Authorisation Application) ont été suspendues en janvier 2010. Cette révocation des autorisations s'est faite en fonction des résultats non concluants obtenus dans la phase III des essais cliniques. Elle marqua la fin des essais cliniques avec le carisbamate pour traiter les patients souffrant (Bialer et al., 2010; Löscher et Brandt, 2010).

Cependant, il est intéressant de noter que les effets les plus intéressants et significatifs produits par le carisbamate dans les études précliniques ont été obtenus lorsque cette drogue était administrée pendant la période de latence (après l'induction de l'agression initiale). Les effets observés indiquent que le carisbamate est le premier médicament déjà décrit avec de réels effets modificateurs de l'épileptogenèse chez près de la moitié des rats traités. Ajoutons à cela l'effet sur la latence d'apparition des crises motrices récurrentes spontanées dans l'autre sous-population des animaux traités, ceux ayant développé in fine une ELT. Ces résultats nous encouragent à persévérer dans l'étude des effets produits par le carisbamate dans des modèles précliniques, ne serait-ce que pour viser une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les effets de cette substance pharmacologique.

### **1.3.3. Mécanismes d'action :**

Nous connaissons déjà bien le rôle joué par divers canaux ioniques dans la modulation de l'excitabilité neuronale. Qui plus est, l'inhibition des canaux sodiques est un mécanisme d'action partagé par plusieurs MAE (Rogawski, 2006). L'administration de carisbamate produit une inhibition des canaux sodiques voltage-dépendants in-vitro, réduisant donc les décharges répétées de potentiels d'action (Liu et al., 2009). Dans une autre étude, après l'administration de carisbamate, Lee et collaborateur (2011) ont pu mettre en évidence une réduction de la transmission glutamatergique, et ce de façon indépendante de la transmission GABAergique. Le mécanisme de cette réduction implique un maillon pré-synaptique dépendant du potentiel d'action et agit sur la force excitatrice des cellules du gyrus denté (Lee et al., 2011). De surcroît, dans la même étude il a été démontré que le carisbamate inhibait les courants post-synaptiques excitateurs évoqués, soit des courants qui dépendent des récepteurs AMPA et NMDA (Lee et al., 2011). Une étude plus récente effectuée par Shin et collaborateurs (2013) a démontré que l'administration de carisbamate augmente l'activation tonique des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT<sub>1A</sub> somatodendritiques, augmentant par là l'action inhibitrice exercée par le système sérotoninergique sur les neurones pyramidaux de l'hippocampe. De plus, il a été montré que l'action du carisbamate pourrait ne pas affecter les canaux calciques pré-synaptiques voltage-dépendants (Lee et al., 2011), ni d'ailleurs les canaux potassiques voltage-dépendants (Liu et al., 2009).

# **Objectifs**

## **2.   OBJETIFS**

Compte tenu de l'importante neuroprotection obtenue avec le traitement par le carisbamate et du fait qu'environ la moitié des rats traités avec le carisbamate ont développé des DPO au lieu de crises convulsives récurrentes spontanées, le travail consigné dans ce mémoire a eu pour objectif principal d'étudier les altérations provenant de l'application de carisbamate démarrant une heure après le SE. Pour cela, nous avons élaboré trois stratégies devant nous permettre :

1) d'effectuer une cartographie cérébrale 4 heures après le début du SE par le biais du marquage de la protéine d'expression précoce c-Fos.

2) d'évaluer les modifications neurochimiques cérébrales 4 heures après le début du SE par la quantification des concentrations d'acides aminés et de monoamines, dans l'hippocampe, le thalamus et le cortex piriforme par HPLC.

3) d'évaluer l'expression différentielle des protéines dans l'hippocampe, deux mois après l'induction du SE, grâce à une électrophorèse en deux dimensions.

## **Méthodes**

### **3. MÉTHODES**

Pour cette étude nous avons utilisé des rats mâles de la souche Sprague-Dawley. Ils ont été fournis par l'Université de Sao Paulo (USP). Les animaux ont été maintenus dans des cages individuelles avec des conditions contrôlées ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12/12h cycle lumière / obscurité), de la nourriture et de l'eau ad libitum. Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le comité d'éthique en recherche de l'Université Fédérale de Sao Paulo – UNIFESP (CEP N° 2072/11). Les expérimentations ont été réalisées suivant les principes et les lignes directrices décrites dans l'ARRIVE (Recherche Animale : Rapports sur l'expérimentation in vivo) et dans la déclaration de Bâle (<http://www.basel-declaration.org>). Le concept des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) a été pris en compte dans l'organisation et la planification des expériences. Des efforts ont été faits pour limiter la souffrance des animaux et réduire le nombre d'animaux utilisés.

#### **3.1. Induction du SE et traitement par le carisbamate**

Une administration de chlorure de lithium (127 mg/kg, i.p.) a été effectuée entre 16h et 20h avant l'administration de pilocarpine, ceci afin d'augmenter la sensibilité à la pilocarpine et diminuer considérablement la dose nécessaire de pilocarpine pour induire le SE. Tous les animaux ont fait l'objet d'une administration de méthyl-scopolamine (Sigma-Aldrich; 1 mg/kg, s.c.) pour réduire les effets périphériques de la pilocarpine. Le SE a ensuite été induit par une administration de pilocarpine (Sigma-Aldrich; 25 mg/kg, s.c.) 30 minutes après l'administration de la méthyl-scopolamine. Une deuxième administration de méthyl-scopolamine (1 mg/kg) a eu lieu 30 minutes après le début du SE. Les animaux du groupe contrôle ont également été traités par le chlorure de lithium et la méthyl-scopolamine, mais ils ont reçu du sérum physiologique à la place de la pilocarpine.

Une heure après le début du SE, les rats ont été injectés avec du diazepam (2,5 mg/kg i.m. ; Roche, Meylan, France) ou avec du carisbamate (90 mg/kg i.p., Johnson & Johnson Research & Development, L.L.C., Raritan, NJ, USA) dissous dans 45 % de hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (AcrosOrganics, Geel, Belgique). La dose de DZP administrée a permis l'augmentation de la survie des animaux sans produire de modifications sur les caractéristiques cliniques et électrographiques du SE (Morrisett et al., 1987). Les rats du groupe contrôle ont été traités par du sérum physiologique à la place du diazepam / carisbamate. Pour les études en phase aiguë du modèle Li-Pilo (cartographie de l'activité cérébrale et changement des acides aminés et des monoamines), les rats n'ont reçu qu'une dose de diazepam / carisbamate ; ils ont été sacrifiés 4h après le début du SE. Les animaux destinés à l'étude en phase chronique du modèle Li-Pilo (l'étude protéomique et de western blotting) ont subi deux administrations quotidiennes de carisbamate pendant 7 jours consécutifs (**Figure 5**).



## Design expérimental

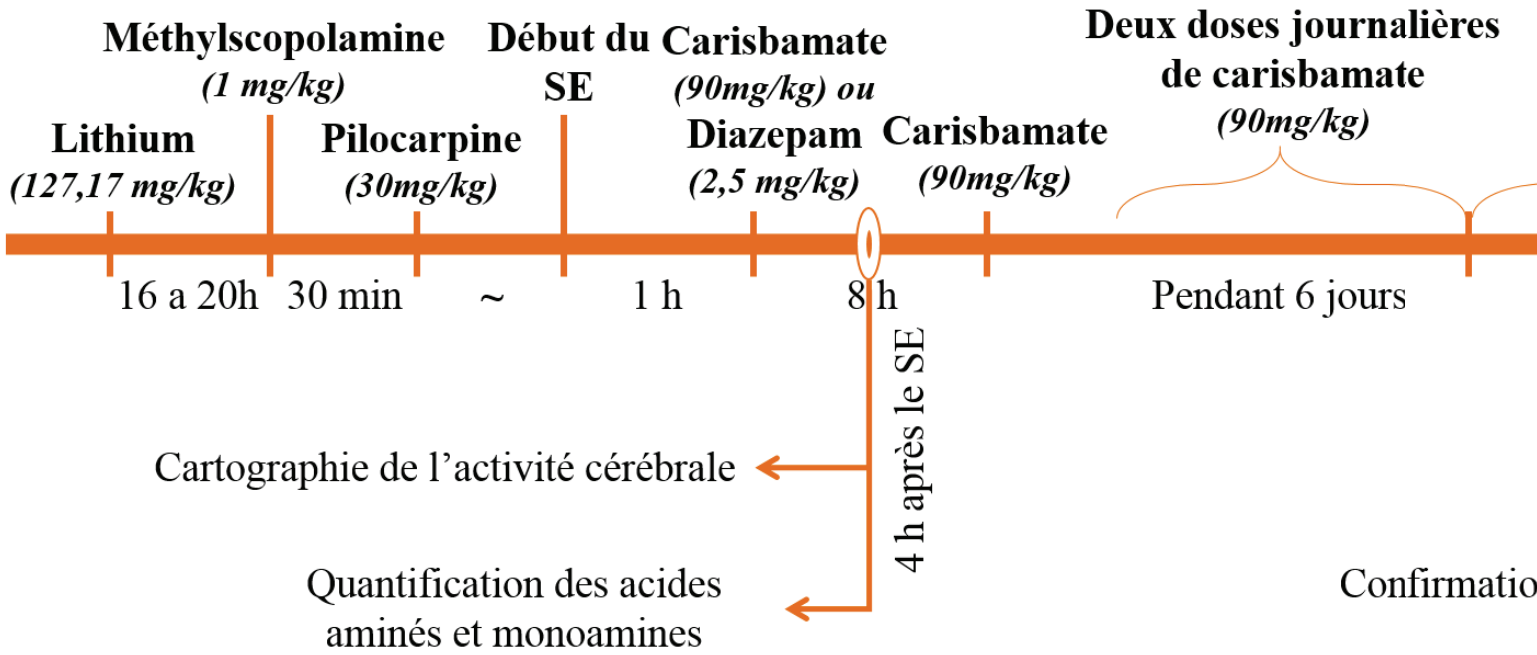


Figure 5: Design expérimental

### **3.2. Les groupes expérimentaux**

Pour l'étude de phase aiguë, nous n'avons utilisé que trois groupes expérimentaux : 1) un groupe contrôle (CT) qui a reçu du sérum physiologique à la place de la pilocarpine ; 2) groupe DZP, constitué par des rats qui ont été soumis au modèle Li-Pilo et traités par du diazepam 1h après le SE ; et 3) groupe CRS, constitué par des rats qui ont été soumis au modèle Li-Pilo et traités par une dose unique de carisbamate 1h après le début du SE.

Pour l'étude réalisée durant la phase chronique du modèle Li-Pilo, les animaux soumis au SE induit par la pilocarpine ont été surveillés par vidéo 24/24h à partir du 7e jour après le SE et pendant 2 mois pour vérifier le développement ou non de crises convulsives généralisées. En nous basant sur l'observation des enregistrements vidéo, nous avons pu constituer 4 groupes expérimentaux, et ce de la façon suivante : 1) un groupe contrôle (CT) qui a reçu du sérum physiologique à la place de la pilocarpine ; 2) un groupe DZP, constitué par des rats qui ont été soumis au modèle Li-Pilo et traités avec du diazepam 1h après le début du SE ; 3) un groupe CRS-ELT, constitué par des rats qui ont été soumis au modèle Li-Pilo et ont reçu 2 doses journalières de carisbamate pendant 7 jours. Dans ce groupe n'ont été retenus a posteriori que ceux qui ont pas développé de crises limbiques ; et 4) un groupe CRS-EA, constitué par des rats qui ont été soumis au modèle Li-Pilo et ont reçu 2 doses journalières de carisbamate pendant 7 jours, dans ce groupe n'ont été retenus a posteriori que ceux qui n'ont pas développé de crises limbiques.

### **3.3. Immunohistochimie pour marquage de la protéine c-Fos**

Trois heures après le début du SE, les animaux destinés au marquage de la protéine d'expression précoce c-Fos ont été sacrifiés (N=5/groupe) par injection d'une solution de kétamine (80mg/kg, i.p.) et xylazine (30 mg/kg, i.p.). A suivi une perfusion transcardiaque avec une solution saline (0,9 %), puis avec une solution de

paraformaldéhyde (4 %) préparé dans 0.1M de tampon phosphate (PB, Sigma-Aldrich, pH 7.4).

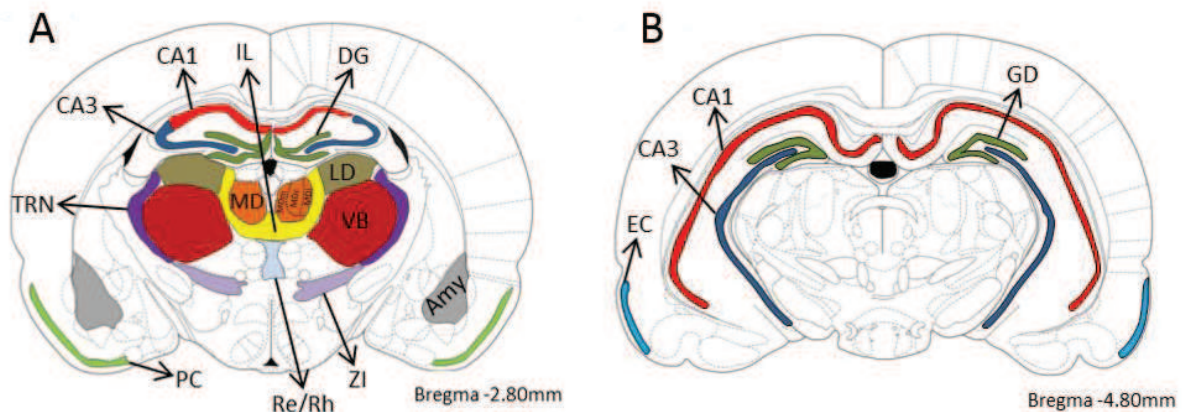
Après la perfusion, les encéphales ont été immergés dans une solution de fixation pendant 20h, puis retirés du crâne et maintenus en post-fixation pendant la nuit. Les encéphales ont alors été coupés en tranches coronales d'une épaisseur de 40  $\mu$ m en coupes flottantes à l'aide d'un vibratome. Les tranches ont été stockées dans une solution cryoprotectrice à -20°C. Les coupes ont été sélectionnées sur la base d'une coupe récupérée toutes les 10 coupes), entre le Bregma -3,72 mm et -9,84 mm.

En vue de l'immunomarquage de la protéine c-Fos, les coupes ont été incubées pendant 24h à 4°C avec l'anticorps polyclonal primaire anti-c-Fos (1:1000, Calbiochem). Après un lavage avec du PB, les tranches ont été incubées pendant 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire biotinylé. Après un nouveau lavage au PB, les tranches ont été incubées avec une solution de streptavidine peroxydase pendant 1h avec chacun des kits de réactifs LSAB (Vector Laboratories). La révélation du marquage positif a été faite par une solution de 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich). Les tranches ont été lavées au PB, séparées, puis montées sur des lames. La spécificité de l'anticorps a été testée par incubation en l'absence d'anticorps primaire.

### **3.4. Délimitation des régions d'intérêt**

Les limites de la région hippocampique (GD, CA1 et CA3) ont été déterminées par l'apparition des régions CA et GD (soit à Bregma -1.72 mm) jusqu'à la disparition du GD dans la partie postérieure (soit Bregma -6.84 mm). Les limites du noyau latéral de l'amygdale (Amy) ont été fixées entre les antériorités par rapport à Bregma de -1.72 mm et -3.72 mm. Les limites du cortex piriforme (Pir) ont été posées entre les bregmas +3.72 mm et -4.92 mm. Pour le cortex entorhinal (Ent), nous avons considéré les bregmas entre

-5.04 mm et -6.84 mm. Les limites des noyaux thalamiques (Ventrobasal – VB ; paraventriculaire – PV ; intermediolateral – IM ; noyauréticulalthalamique - NRT ; reuniens/rhomboïde - ReRh ; médiodorsal – MD ; et latérodorsal – LD) et du noyau sous-thalamique zona incerta (ZI) ont été considérées entre les bregmas -1.20 mm et -3.96 mm. Pour toutes les régions d'intérêt, les contours ont été définis à l'aide du logiciel Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France) et des coordonnées de l'atlas de Paxinos & Watson (2007). La **Figure 6** montre un schéma de toutes les régions d'intérêt.



**Figure 6** : Schéma de définition des régions d'intérêt

### 3.5. Stéréologie

La quantification stéréologique des cellules c-Fos-positives ainsi que le volume des régions d'intérêt ont été obtenus par application de la méthode de Cavalieri, combinée à un échantillonnage systématique aléatoire (Gundersen et al., 1999). La précision de l'estimation est décrite par le coefficient d'erreur (CE). Les estimations ont été effectuées à l'aide du logiciel Mercator et d'un microscope optique (Leica DM5500B). L'analyse a été effectuée avec un objectif 2,5X. Les images numériques en temps réel ont été visualisées par un Microfire de haute résolution et d'une caméra optronique. Pour l'hippocampe, l'amygdale, le cortex piriforme et le cortex entorhinal, j'ai utilisé des

dissecteurs de 30  $\mu\text{m}^2$  et un espacement de 100 x 100  $\mu\text{m}$ . Pour les noyaux thalamiques et la zona incerta j'ai utilisé des dissecteurs de 40  $\mu\text{m}^2$  espacés de 60 x 60  $\mu\text{m}$ .

### **3.6. Dosage des acides aminés et des monoamines par HPLC**

Quatre heures après le début du SE, les animaux destinés à la quantification des acides aminés et des monoamines par HPLC (N=6/groupe) ont été sacrifiés par décapitation et les structures d'intérêt ont été retirées de façon précise, pesées et stockées à  $-80^\circ\text{C}$ .

Les acides aminés aspartate (ASP), glutamate (GLU), glutamine (GLN), glycine (GLY), taurine (TAU) et gamma-aminobutyrate (GABA) ont été quantifiés par HPLC avec détection par fluorescence. La méthode a déjà été décrite par Cavalheiro et collaborateurs (1994). Immédiatement après la décapitation, le cortex, l'hippocampe et le thalamus ont été retirés sur une plaque de glace, pesés et stockés à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'au jour de l'expérience. Les tissus ont été homogénéisés par ultrasons dans de l'acide perchlorique (0,1M) contenant du disulfate de sodium 0,02% et de l'homosérine (10 mg/ml), utilisé comme contrôle interne dans une proportion de 15 mL de solution pour chaque milligramme de tissu humide. Les échantillons ont été maintenus à  $4^\circ\text{C}$  pendant la nuit, puis centrifugés à 11.000 g à  $4^\circ\text{C}$  pendant 50 minutes. Les échantillons ont été dérivatisés avant d'être injectés dans l'HPLC. Le réactif de dérivatisation a été préparé à partir de la dissolution de 27 mg d'ortho-phthalaldéhyde (OPA) dans 1 mL de méthanol, 5 mL de 2-mercaptoéthanol (ME) et 9 mL de tétraborate de sodium 0,1 M (pH 9,3). Cette solution OPA/ME a été préparée immédiatement avant l'utilisation. La dérivatisation de la pré-colonne des acides aminés a été réalisée à l'aide d'un mélange de 50  $\mu\text{l}$  de l'échantillon avec 100  $\mu\text{l}$  de la solution OPA/ME, exactement 2 min avant l'injection dans la colonne analytique.

La séparation a été faite à l'aide d'un injecteur Rheodyne avec une capacité de 20 µl, couplé à une colonne LiChrospher 100, RP-18 (50 x 4,6 mm) pour un débit de 3,5 ml/min. La phase mobile était constituée d'un tampon à base de phosphate de sodium 0,05 M (pH 5,95) et de 11,5 % de méthanol.

Les concentrations en acides aminés ont été exprimées en mmol/mg de tissu (moyenne  $\pm$  95 % IC). La courbe standard des acides aminés a été obtenue à partir de l'injection d'un mélange contenant des concentrations connues en acides aminés d'intérêt, au début et entre chaque série de 6 échantillons. Les concentrations en acides aminés dans les échantillons ont été mesurées à partir de la courbe standard.

Les dosages de noradrénaline (NA), dopamine (DA), sérotonine (5-HT), et de leurs métabolites 3-métoxy-4-diidrophénilglicol (MHPG), acide 3,4-diidroxiphénilacétique (DOPAC) et l'acide 5-hydroxiindolacétique (5-HIAA), respectivement, ont été faits à partir des mêmes échantillons dans des conditions chromatographiques similaires, et avec détection par fluorescence. Les concentrations des monoamines ont été exprimées en ng/g de tissu (moyenne  $\pm$  95 % IC).

### **3.7. Protéomique**

Deux mois après le SE, les animaux destinés à l'étude de protéomique (N=4/groupe) ont été décapités, les encéphales ont été rapidement retirés du crâne et les hippocampes ont été précisément disséqués, retirés, pesés, puis stockés à -80°C.

Les hippocampes ont été homogénéisés avec un tampon de lyse. L'homogénat a été ensuite centrifugé et la concentration des protéines a été déterminée.

### **3.7.1. Électrophorèse en deux dimensions**

Cinq cent  $\mu\text{g}$  de protéine de l'hippocampe de chaque animal ont été utilisés pour l'électrophorèse en deux dimensions. Une bande IPG avec un pH linéaire a été utilisée pour la séparation en première dimension. Une réhydratation passive a été effectuée pendant 6 h. Ensuite l'isoélectrofocalisation a été effectuée pendant une dizaine d'heures. Après cela, la focalisation a été effectuée en 7 étapes, selon la séquence suivante : à 100 V pendant 30 min ; à 250 V pendant 2 h ; à 500 V pendant 30 min ; à 1000 V pendant 30 min ; à 2000 V pendant 30 min ; à 4000 V pendant 1 heure ; à 8000 V pendant 1 heure. Après 6 h de réhydratation, le voltage a été augmenté graduellement de façon linéaire jusqu'à atteindre 30000 VH. Finalement, un voltage de 300V a été appliqué pendant 2 h. La température a été maintenue à 20°C durant toute la procédure. Après l'isoélectrofocalisation, les bandes IPG ont été équilibrées en tampon d'équilibre pendant 15 min. Les bandes ainsi équilibrées ont alors été correctement placées pour lancer la deuxième dimension de la séparation en SDS-PAGE. Cette étape a été effectuée avec un courant constant de 20 mA/gel pendant 1 h, puis passée à 40 mA/gel jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait atteint la fin du gel. Une fois la course terminée, les gels ont été colorés avec du bleu de Coomassie pendant 48 h.

### **3.7.2. Densitométrie**

Les gels ont été lavés avec de l'eau distillée pendant 15 min jusqu'à ce que les spots deviennent clairs. Les gels ont alors été scannés à l'aide d'un densitomètre calibré GS-800 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Le logiciel PDQuest 2D-gel (Version 8.0.1, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) a été utilisé pour la procédure d'analyse des images. Après la détection automatique, les spots ont été manuellement édités pour corriger d'éventuelles erreurs. Pour l'analyse quantitative, les spots ont été

normalisés à partir de la densité optique totale de chaque gel. Les valeurs de densité normalisée ont été utilisées pour la comparaison. Les spots qui ont présenté une différence (augmentation ou diminution) d'au moins une fois et demie ont été utilisés pour l'identification par spectrométrie de masse.

### **3.7.3. Digestion en gel**

Après la comparaison entre les différents groupes expérimentaux, les spots qui ont présenté des différences entre les groupes ont été coupés du gel en vue de l'identification. Pour une plus grande fiabilité, les spots d'intérêt a été coupé par duplicats (appartenant à différents groupes). Ensuite, trois lavages ont été effectués dans une solution contenant 100 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 50 % d'acétonitrile et 50 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ . Après avoir retiré le surnageant, chaque morceau de gel découpé contenant un spot a été incubé avec de la trypsine (200 ng trypsine dans 50 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  et 10 % d'acétonitrile dans l'eau) pour la digestion protéique pendant la nuit à 37°C. La digestion a été interrompue par addition d'acide formique 2 % pendant 1 h, puis le surnageant a été transféré dans un récipient destiné à être inséré dans le nano-LC-ESI-MS/MS pour l'identification de protéines.

### **3.7.4. Analyse en nano-LC-ESI-MS/MS**

L'analyse pour l'identification des protéines par nano-LC-ESI-MS/MS a été effectuée en collaboration avec le Laboratoire National de la Lumière Synchronron (LNLS) à Campinas (Brésil). Pour une plus grande fiabilité, l'identification des protéines a été réalisée à l'aide du système de recherche ionique MS/MS MASCOT (Matrix Science, London, UK) en utilisant deux des bases de données internationales les plus utilisées : le NCBI et l'IPI. Cette identification a été réalisée avec les paramètres suivants :



modification fixe - Carbamidométhyl (C) ; modifications variables - acétylation (K), méthylation (K), méthylation (R), oxydation (HW), oxydation (M), phosphorylation (ST) ; Valeurs de masse mono-isotopiques ; masse protéique non restreinte ; tolérance de masse peptidique  $\pm 0,1$  Da ; tolérance de masse des fragments  $\pm 0,1$  Da ; maximum de perte -1 ; nombre de demandes - 96.

### **3.7.5. Interactome**

Une fois la liste de protéines d'intérêt obtenue, nous avons procédé à une série de post-analyses, Tout d'abord, nous avons inséré le nom de chaque protéine d'intérêt pour obtenir les numéros d'accès UniProtKB à l'aide de l'outil bioinformatique UniProtKB ID Mapping (disponible sur le site web [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Avec les numéros d'accès, nous avons utilisé la base de données du système bioinformatique ExPASy afin d'obtenir, au moyen de l'outil "compute pI/Mw" ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)), les points isoélectriques (pI) et les poids moléculaires (Mw) théoriques de chaque protéine d'intérêt. Ensuite, nous avons utilisé le système GENEMania (<http://www.genemania.org>) pour localiser les fonctions biologiques auxquelles les protéines d'intérêt sont liées. Le système Quick GO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO>) nous a permis d'effectuer une représentation graphique de fonctions biologiques générées par le système GENEMania, ce qui nous a permis d'identifier des fonctions biologiques principales. Puis, nous avons utilisé la base de données Reactome ([www.reactome.org](http://www.reactome.org)) qui nous a permis de trouver des réactions physiologiques auxquelles les protéines d'intérêt sont liées. Toutes les informations ont été rassemblées dans le logiciel Cytoscape, ce qui a facilité l'intégration et l'analyse de ce grand volume d'informations.

### 3.7.6. Western Blot

La confirmation de l'expression de protéines identifiées dans l'étude protéomique a été effectuée par western blotting. Deux mois après le SE, les animaux destinés à la confirmation par western blotting (N=6/groupe) ont été décapités, la formation hippocampique des animaux a été rapidement disséquée sur une plaque glacée, lavée avec une solution saline (0,9%) pour retirer l'excès de sang, pesée et stockée à -80°C.

Les tissus ont été homogénéisés à l'aide d'un sonicateur dans un tampon de lyse (proportion 1:5, poids : volume) consistant en de l'eau distillée contenant 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 ; 150 mM de NaCl, 0,1 % de SDS ; 1 % de Triton X-100 ; 0,02 % d'azide de sodium et 1 % d'un cocktail inhibiteur de protéases (Sigma-Aldrich). Après l'homogénéisation, les échantillons ont été centrifugés (12.000 rpm à 4°C pendant 20 min), les surnageant ont été transférés dans des microtubes et les sédiments ont été jetés. La concentration des protéines dans les échantillons a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

Avant le début de l'électrophorèse en gel, les échantillons ont été dénaturés en tampon de dénaturation (proportion 1:1), contenant : 125mM de Tris-HCl pH 6,8 ; 4 % de SDS ; 20 % de glycérol ; 0,006 % de bromophénol ; 1,1 M de  $\beta$ -mércaptoéthanol dans de l'eau distillée, et chauffés à 95°C pendant 5 min (Laemmli, 1970).

Les gels d'électrophorèse SDS-PAGE ont été préparés avec un gel d'empilement à 5 % contenant : 126 mM de Tris base pH 6,8 ; 5 % d'acrylamide mix ; 0,1 % de SDS ; 0,1 % d'APS ; 0,01 % de Temed dans de l'eau distillée. Le gel de séparation à 10 % contenant : 370 mM de Tris base pH 8,8 ; 10 % d'acrylamide mix ; 0,1 % de SDS ; 0,1 % de APS ; 0,04 % de tétraméthylethylènediamine dans de l'eau distillée. Le système d'électrophorèse (MiniProtean, Bio-Rad) a été utilisé avec un tampon de course contenant : 25 mM de Tris base ; 192 mM de glycine ; 3,5 mM de SDS dans de l'eau distillée. Un standard de protéines de différents poids moléculaires connus (Page Ruler TM Plus

Prestained Protein Ladder - Thermo Scientific) a été utilisé pour l'identification des bandes d'intérêt. Les échantillons contenant 40 µg de protéine (pour Pebp1 et Pkm2) ou 60 µg (pour Dpysl2 et Pdhb) ont été dénaturés. Pour chaque essai, le système d'électrophorèse a été ajusté à 50 V pour empiler les protéines (pendant approximativement 20 min) et à 90 V pour séparer les protéines (environ 1 h).

Après l'étape d'électrophorèse, les bandes ont été transférées par electroblotting (Mini Trans-Blot Cell, BioRad) vers des membranes de fluorète de polivinilidene (PVDF) avec des pores de 0,45 µm (Amersham Pharmacia Biotech, Hybond-P), précédemment activés en méthanol (1 à 3 sec), eau distillée (1 minute) et tampon de transfert (5 min) composé de 25 mM de Tris base ; 192 mM de glycine ; 20 % de méthanol dans de l'eau distillée. Le transfert a été réalisé à 110 V pendant 90 min.

Juste après le transfert, les membranes de PVDF ont été incubées dans une solution contenant 5 % de sérumalbumine bovine (BSA) dans du tampon Tris base (pH 7,6) avec du tween 20 (TBS-T), composé de 65 mM de Tris base ; 154 mM de NaCl ; 0,05 % de Tween 20 dans de l'eau distillée, pendant 30 min à température ambiante, et maintenu en légère agitation, afin de bloquer les sites interspécifiques. Les membranes ont alors été incubées avec l'anticorps primaire Anti-Pkm2 (1:1000, Sigma Aldrich), Anti-Dpysl2 (1:2000, Sigma Aldrich), Anti-Pdhb (1:1000, Sigma Aldrich) et Anti-Pebp1 (1:1000, produit chez la chèvre, Sigma Aldrich), dilué en TBS-T avec 2 % de BSA. L'incubation a duré 24 h à 4°C. Le jour suivant, les membranes ont été lavées avec du TBS-T (trois fois 10 min) et incubées avec l'anticorps secondaire Anti-IgG de lapin produit chez la chèvre 1:2000, Calbiochem (pour les anticorps Anti-Pkm2 et Anti-Dpysl2), Anti-IgG de souris produit chez la chèvre - 1:2000, Calbiochem (pour l'Anti-Pdhb), et l'Anti-IgG de chèvre produit chez le lapin 1:2000, Calbiochem (pour l'Anti-Pebp1), conjuguées avec de la peroxydase pendant 2 h à température ambiante avec une

légère agitation. Puis les membranes ont été lavées avec du TBS-T (3 X 10 min), soumises à la procédure d'immunodétection des bandes par chimioluminescence (Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate - Thermo Scientific) et révélées à l'aide d'un photo documentateur (Uvitec, Cambridge). Enfin, les membranes ont été lavées en TBS-T (trois fois 10 min) et incubées avec l'anticorps monoclonal anti- $\beta$ -actine, produit chez la souris et conjugué à la peroxydase (1:2000, A3854 - Sigma-Aldrich), pendant 2 h à T°C ambiante avec une légère agitation. La révélation a été réalisée selon la méthode décrite ci-dessus.

Les bandes ont été quantifiées par densitométrie optique (DO) à l'aide du logiciel UvitecBand Analyse en partant du rapport entre la DO des protéines d'intérêt et celle de la  $\beta$ -actine correspondante, pour permettre une normalisation des données préalablement à toute analyse.

### **3.8. Analyse statistique**

Dans cette étude nous avons utilisé une Analyse de Variance – ANOVA à un facteur. Cependant, étant donné le nombre réduit d'observations dans cette étude (de 4 à 6 par groupe) les analyses ont été faites basées sur 10000 ré-échantillonnages par bootstrap.

En outre, vu la grande quantité de structures analysées dans l'étude de l'activité cérébrale, nous avons effectué une analyse exploratoire (analyse factorielle) pour vérifier la corrélation de l'activité dans les différentes structures.

Tous les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2013) et les graphiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad (Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA).

## **Résultats**

## 4. RESULTATS

### 4.1. Activation cérébrale par marquage de la protéine c-Fos.

Pour exclure de possibles biais, les valeurs de l'expression de la protéine c-Fos ont été normalisées en tenant compte du volume de chaque structure (nombre de cellules c-Fos positives / volume en mm<sup>3</sup>). Le **Tableau 1** montre le nombre de cellules c-Fos positives dans les différentes régions d'intérêt.

**Tableau 1.** Quantification de cellules c-Fos positives

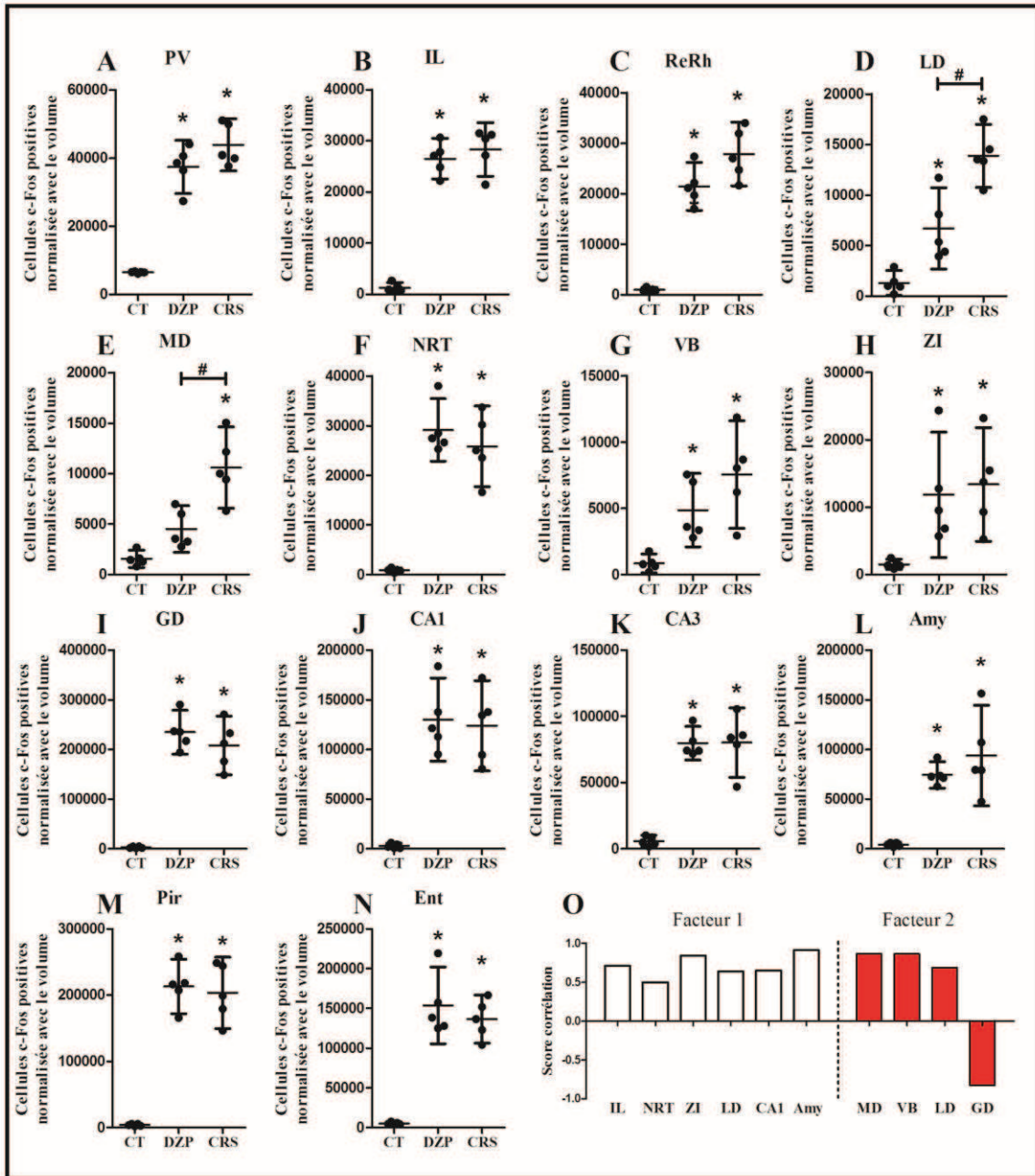
Structure	Nombre de cellules			ANOVA	Bootstrap
	CT	DZP	CRS		
<b>PV</b>	6471	37435 *	43927 *	F <sub>(2,12)</sub> = 77,17; p<0.001	p<0.001
<b>IL</b>	1275	26498 *	28314 *	F <sub>(2,12)</sub> = 119,88; p<0.001	p<0.001
<b>ReRh</b>	995	21466 *	27867 *	F <sub>(2,12)</sub> = 73,00; p<0.001	p<0.001
<b>MD</b>	1571	4517	10588 * #	F <sub>(2,12)</sub> = 21,85; p<0.001	p<0.001
<b>NRT</b>	880	29169 *	25824 *	F <sub>(2,12)</sub> = 52,09; p<0.001	p<0.001
<b>ZI</b>	1537	11858 *	13409 *	F <sub>(2,12)</sub> = 6,08; p=0.015	p=0.009
<b>VB</b>	852	4866 *	7562 *	F <sub>(2,12)</sub> = 10,59; p=0.002	p=0.003
<b>LD</b>	1291	6698 *	13880 * #	F <sub>(2,12)</sub> = 33,66; p<0.001	p<0.001
<b>GD</b>	2865	234694 *	208044 *	F <sub>(2,12)</sub> = 68,35; p<0.001	p<0.001
<b>CA3</b>	5832	79664 *	80145 *	F <sub>(2,12)</sub> = 48,48; p<0.001	p<0.001
<b>CA1</b>	2724	130109 *	123864 *	F <sub>(2,12)</sub> = 31,19; p<0.001	p<0.001
<b>Pir</b>	3778	213143 *	203401 *	F <sub>(2,12)</sub> = 70,09; p<0.001	p<0.001
<b>Ent</b>	5117	153586 *	136315 *	F <sub>(2,12)</sub> = 47,08; p<0.001	p<0.001
<b>Amy</b>	4097	74388 *	93834 *	F <sub>(2,12)</sub> = 18,78; p<0.001	p<0.001

ANOVA et test post-hoc Tukey avec 10.000 ré-échantillonnage par bootstrap du nombre de cellules c-Fos positives. **PV** - paraventriculaire; **IL** - intralaminaire; **ReRh** - reuniens/ rhomboïde; **MD** – médiorsal ; **NRT** – Noyaux réticulaire thalamique ; **ZI** - zona incerta; **VB** - ventro-basal; **LD** - latérodorsal; **GD** – gyrus denté; **CA3** - *cornu ammonis* 3; **CA1** - *cornu ammonis* 1; **Pir** – cortex piriforme; **Ent** - cortex entorhinal; **Amy** - amygdala.

**Codes** : (\* p<0.05) Différence par rapport au groupe CT ; (# p<0.05) Différence par rapport au groupe DZP

Les résultats indiquent qu'il existe une différence significative pour toutes régions analysées. Le test post-hoc de Tukey a révélé que cette différence est due, principalement, à un nombre plus important de cellules c-Fos positives dans les groupes DZP et CRS comparativement au groupe CT, indiquant ainsi que toutes les structures analysées sont

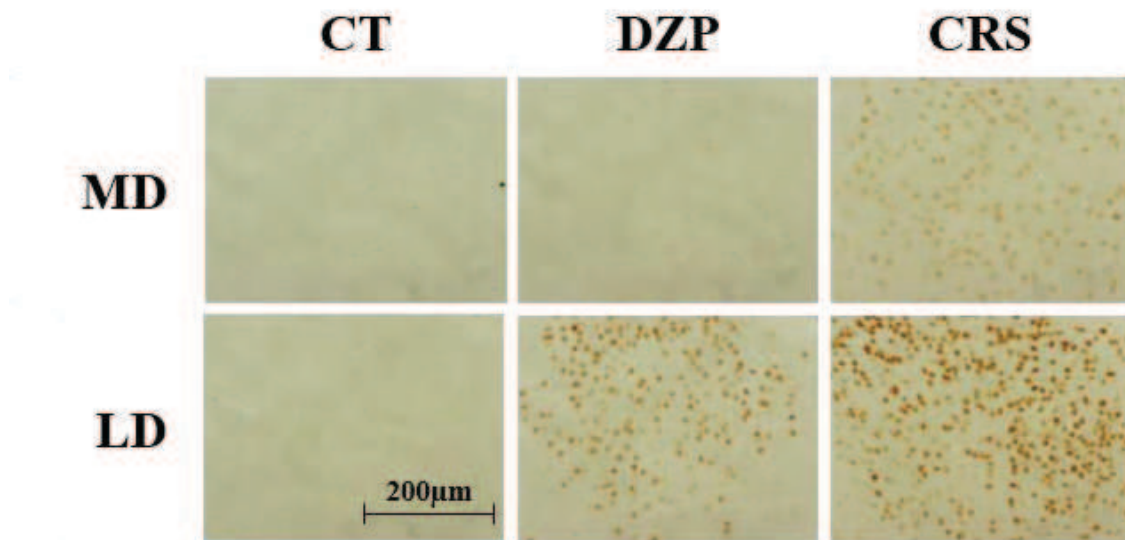
activées 4h après le début du SE. L'unique exception à cela est le noyau MD du thalamus, qui ne présente une augmentation significative que dans le groupe CRS comparativement au groupe CT (**Figure 7E**). Concernant la différence existant entre les animaux du groupe



**Figure 7:** Moyenne  $\pm$  95% IC du nombre de cellules marqué avec la protéine c-Fos: **A)** noyau paraventriculaire - PV; **B)** noyau intralaminaire - IL; **C)** noyau reuniens e rhomboïde - ReRh; **D)** noyau latérodorsal - LD; **E)** noyau médiodorsal - MD; **F)** noyau réticulaire do thalamus - NRT; **G)** complexe ventrobasal - VB; **H)** noyau sous-thalamique zona incerta - ZI; **I)** Gyrus denté - GD; **J)** CA1; **K)** CA3; **L)** amygdala - Amy; **M)** cortex piriforme - Pir; e **N)** cortex entorhinal - Ent. Dans la figure **O)** nous avons le facteur 1 e 2 obtenu par l'analyse factorielle. **Codes :** Différence par rapport au groupe CT (\*  $p < 0,05$ ) ; différence par rapport au groupe DZP (#  $p < 0,05$ ).

DZP et CRS, ce qui reflète plus particulièrement l'effet du traitement par le carisbamate dans l'activité cellulaire des structures analysées, les résultats indiquent une augmentation de l'activité, mais seulement dans les noyaux MD et LD du thalamus (**Figure 7D et E**).

La **Figure 8** montre le marquage de c-Fos dans les noyaux MD et LD du thalamus.



**Figure 8** : Marquage des cellules c-Fos-positives dans les noyaux MD et LD du thalamus dans les différents groupes. Avec un objectif de 20X. **MD** – mediodorsal ; **LD** - latérodorsal.

L'analyse factorielle a généré 2 facteurs. Le **Tableau 2** nous montre la charge factorielle (ou score de corrélation) qui indique la corrélation des variables avec les facteurs générés. Dans le 1<sup>er</sup> facteur nous avons une corrélation significative entre les noyaux IL, NRT et LD du thalamus, la ZI et l'Amy, et dans le 2<sup>ème</sup> nous avons observé une corrélation positive des noyaux MD, VB e LD, ceux qui ont une corrélation négative avec le GD (**Figure 7-O**). Étant donné que l'analyse factorielle cherche à vérifier l'existence d'une corrélation entre les variables mesurées, le fait que deux structures (ou plus) appartiennent à un même facteur signifie que elles ont une variance similaire, et la charge factorielle pointe si cette corrélation est positive ou négative.



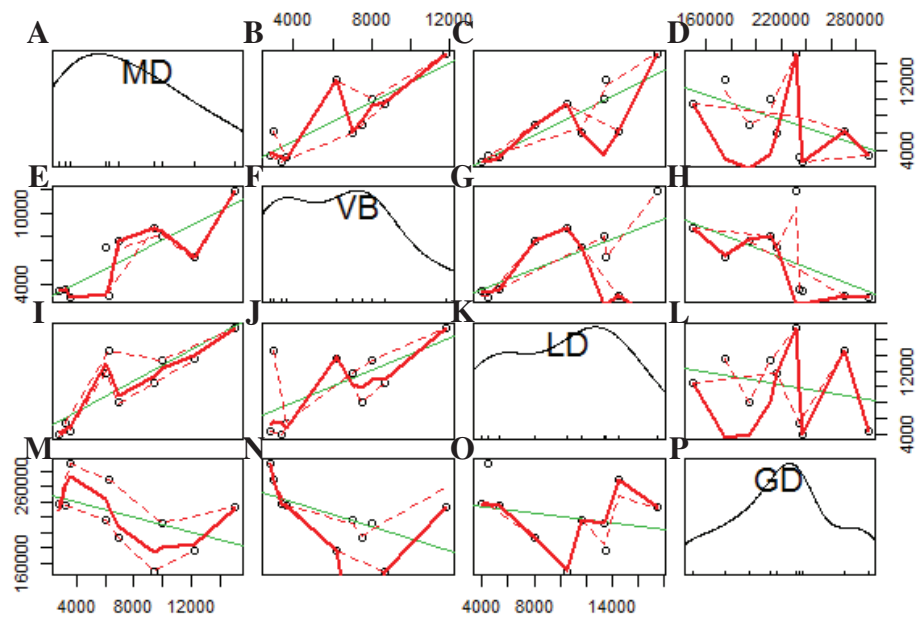
**Tableau 2.** Analyse factorielle de l'expression de la protéine c-Fos.

Structure	Facteur 1	Facteur 2
	Score de corrélation	Score de corrélation
PV	0.087	-0.065
<b>IL</b>	<b>0.709 *</b>	0.149
<b>ReRh</b>	0.694	0.602
<b>MD</b>	0.354	<b>0.866 *</b>
<b>NRT</b>	<b>0.499 *</b>	-0.613
<b>ZI</b>	<b>0.840 *</b>	0.083
<b>VB</b>	0.258	<b>0.864 *</b>
<b>LD</b>	<b>0.642 *</b>	<b>0.690 *</b>
<b>GD</b>	0.525	<b>-0.825 *</b>
<b>CA3</b>	0.579	-0.248
<b>CA1</b>	<b>0.650 *</b>	-0.582
<b>Pir</b>	0.608	-0.536
<b>Ent</b>	0.511	-0.322
<b>Amy</b>	<b>0.913 *</b>	0.209

Score de corrélation (charge factorielle) obtenu avec l'analyse factorielle. **PV** - paraventriculaire; **IL** - intralaminaire; **ReRh** - reuniens/rhomboïde; **MD** – médiodorsal ; **NRT** – Noyaux réticulaire thalamique ; **ZI** - zona incerta; **VB** - ventro-basal; **LD** - latérodorsal; **GD** – gyrus denté; **CA3** - *cornu ammonis* 3; **CA1** - *cornu ammonis* 1; **Pir** – cortex piriforme; **Ent** - cortex entorhinal; **Amy** - amygdala.

Codes : (\*)  $p < 0.05$

Ainsi, nous pouvons observer dans la **Figure 9** une matrice de dispersion qu'illustre la corrélation existante entre les différentes structures incluses dans le 2<sup>ème</sup> facteur obtenue avec l'analyse factorielle. Nous pouvons observer qu'il y a une corrélation positive entre les trois noyaux thalamiques (**Figure 9-B, C e G**), ainsi qu'une importante corrélation négative du MD, VB et LD avec le GD (**Figure 9-D, H et L**). Autrement dit, les données indiquent que les animaux ayant un marquage plus important de cellules c-Fos-positives dans le noyau MD ont également une augmentation dans les noyaux VB et LD, ainsi qu'un marquage moins important dans le GD. Et, inversement, les animaux qui présentent un marquage moins important dans le MD ont aussi un marquage réduit dans VB et LD, ainsi qu'un marquage plus important dans la région du GD.



**Figure 9:** Matrice de dispersion des régions incluses dans le facteur 2 de l'analyse factorielle. **MD** – médiodorsal ; **VB** – Ventrobasal ; **LD** – latérodorsal ; **GD** – gyrus denté.

## 4.2. Monoamines et acides aminés

### 4.2.1. L'hippocampe.

Les concentrations des acides aminés et des monoamines dans l'hippocampe sont résumées dans le **Tableau 3**.

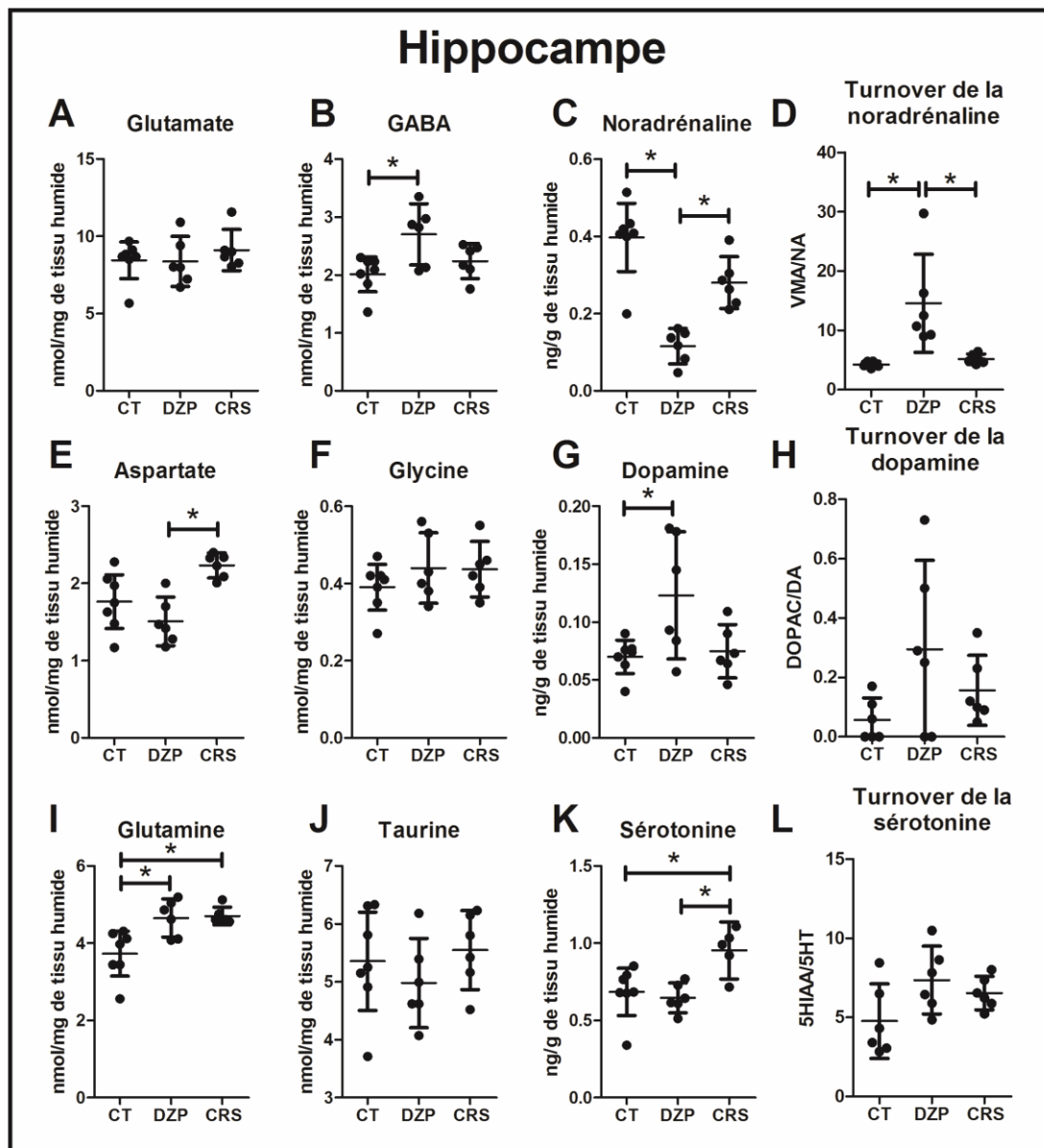
**Tableau 3** : Concentration de monoamines et acides aminés dans l'hippocampe

Monoamines	ng/g de tissu			ANOVA	Bootstrap
	CT	DZP	CRS		
NA	0.39	0.12 *	0.28 #	$F_{(2,15)}= 20,73$ ; $p<0.001$	$p<0.001$
VMA	1.64	1.43	1.41	$F_{(2,15)}= 1,64$ ; $p=0.226$	$p=0.269$
VMA/NA	4.27	14.58 *	5.16 #	$F_{(2,15)}= 9,33$ ; $p=0.002$	$p=0.002$
DA	0.07	0.12	0.07	$F_{(2,15)}= 4,31$ ; $p=0.033$	$p=0.087$
DOPAC	0.01	0.02	0.02	$F_{(2,15)}= 0,67$ ; $p=0.521$	$p=0.383$
DOPAC/DA	0.23	0.17	0.24	$F_{(2,15)}= 0,74$ ; $p=0.490$	$p=0.311$
HVA	0.07	0.08	0.08	$F_{(2,15)}= 0,06$ ; $p=0.941$	$p=0.492$
HVA/DA	1.04	0.66	1.06	$F_{(2,15)}= 3,78$ ; $p=0.046$	$p=0.051$
5HT	0.68	0.65	0.95 * #	$F_{(2,15)}= 8,50$ ; $p=0.003$	$p=0.007$
5HIAA	0.30	0.51 *	0.48 *	$F_{(2,15)}= 11,55$ ; $p<0.001$	$p<0.001$
5HIAA/5HT	4.76	7.36	6.54	$F_{(2,15)}= 3,09$ ; $p=0.075$	$p=0.136$
<b>Acides aminés</b>	<b>nmol/mg de tissu</b>				
ASP	1.77	1.51	2.23 #	$F_{(2,15)}= 8,59$ ; $p=0.003$	$p=0.005$
GLU	8.42	8.37	9.11	$F_{(2,15)}= 0,51$ ; $p=0.608$	$p=0.382$
GLN	3.63	4.65 *	4.67 *	$F_{(2,15)}= 9,94$ ; $p<0.001$	$p=0.002$
GLI	0.38	0.44	0.44	$F_{(2,15)}= 1,00$ ; $p=0.388$	$p=0.288$
TAU	5.39	4.98	5.55	$F_{(2,15)}=0,78$ ; $p=0.471$	$p=0.311$
GABA	2.00	2.70 *	2.24	$F_{(2,15)}= 4,99$ ; $p=0.021$	$p=0.045$

ANOVA e pós-teste Tukey com 10.000 reamostragens bootstrap das concentrações de aminoácidos e monoaminas no hipocampo. **VMA** - acide vanillylmandélique ; **NA** - Noradrénaline; **DOPAC** - Acide 3,4-hydroxyphénylacétique ; **DA** - Dopamine; **5-HIAA** - acide 5-hydroxindolacético; **HVA** – acide homovanillique ; **5-HT** - Serotonine; **ASP** - Aspartate; **GLU** - Glutamate; **GLN** - Glutamine; **GLI** - Glycine; **TAU** – Taurine; **GABA** – Acide gamma aminobutyrique . **Codes** : (\*  $p<0.05$ ) Différence par rapport au groupe CT ; (#  $p<0.05$ ) Différence par rapport au groupe DZP

Les résultats obtenus avec la quantification des monoamines indiquent une augmentation de la concentration du GABA et de la GLN chez les animaux du groupe DZP comparativement au groupe CT (**Figure 10-B, I**). Dans le groupe CRS il y a eu une augmentation comparativement au groupe CT et d'ASP quand comparé au groupe DZP (**Figure 10-E, I**).

La quantification des monoamines dans l'hippocampe a indiqué une diminution du niveau de la NA, accompagné d'une augmentation de son taux d'utilisation dans les animaux du groupe DZP comparativement aux groupes CT et CRS (**Figure 10-C e D**). De même qu'augmentation du niveau de la DA, sans altération de son turnover, dans le groupe DZP par rapport aux groupes CT (**Figure 10-G, H**). Nous avons observé également une augmentation de la 5-HT, sans altérations de son turnover, dans les animaux du groupe CRS par rapport aux groupes CT et DZP (**Figure 10-K, L**).



**Figure 10** : Acides aminés et monoamines dans l'hippocampe : VMA - acide vanillylmandélique ; NA - Noradrénaline; DOPAC - Acide 3,4-hydroxyphénylacétique ; DA - Dopamine; 5-HIAA - acide 5-hydroxindolacético; HVA – acide homovanillique ; 5-HT - Serotonine; ASP - Aspartate; GLU - Glutamate; GLN - Glutamine; GLy - Glycine; TAU – Taurine; GABA – Acide gamma aminobutyrique. Codes \*  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2. Le thalamus

Les résultats obtenus avec la quantification des monoamines et acides aminés dans le thalamus sont résumé dans **Tableau 4**.

**Tableau 4** : Concentration de monoamines et acides aminés dans le thalamus

Monoamines	ng/g de tissu			ANOVA	Bootstrap
	CT	DZP	CRS		
NA	0.71	0.33 *	0.51 *	$F_{(2,15)}= 19,76$ ; $p<0.001$	$p<0.001$
VMA	1.32	1.27	1.42	$F_{(2,15)}= 0,99$ ; $p=0.392$	$p=0.307$
VMA/NA	1.90	4.14 *	2.84 #	$F_{(2,15)}= 18,07$ ; $p<0.001$	$p<0.001$
DA	0.05	0.09	0.06	$F_{(2,15)}=2,35$ ; $p=0.129$	$p=0.172$
DOPAC	0.01	0.03	0.01	$F_{(2,15)}= 3,19$ ; $p=0.069$	$p=0.128$
DOPAC/DA	0.06	0.29	0.15	$F_{(2,15)}= 2,59$ ; $p=0.107$	$p=0.137$
HVA	0.05	0.09	0.06	$F_{(2,15)}= 1,44$ ; $p=0.267$	$p=0.263$
HVA/DA	1.53	0.88	1.23	$F_{(2,15)}= 1,45$ ; $p=0.264$	$p=0.227$
5HT	1.13	1.12	1.29	$F_{(2,15)}= 1,94$ ; $p=0.177$	$p=0.172$
5HIAA	0.64	1.04 *	0.84	$F_{(2,15)}= 13,16$ ; $p<0.001$	$p<0.001$
5HIAA/5HT	0.57	0.92 *	0.67 #	$F_{(2,15)}= 13,83$ ; $p<0.001$	$p<0.001$
Acides aminés	nmol/mg de tissu				
ASP	2.18	1.80	2.26 #	$F_{(2,15)}= 6,93$ ; $p=0.007$	$p=0.013$
GLU	8.89	8.57	8.22	$F_{(2,15)}= 0,35$ ; $p=0.705$	$p=0.398$
GLN	4.04	5.37 *	5.06 *	$F_{(2,15)}= 17,57$ ; $p<0.001$	$p<0.001$
GLI	0.48	0.50	0.49	$F_{(2,15)}= 0,07$ ; $p=0.932$	$p=0.932$
TAU	2.36	2.15	2.38	$F_{(2,15)}= 1,11$ ; $p=0.354$	$p=0.292$
GABA	2.55	2.51	2.23	$F_{(2,15)}= 1,90$ ; $p=0.182$	$p=0.156$

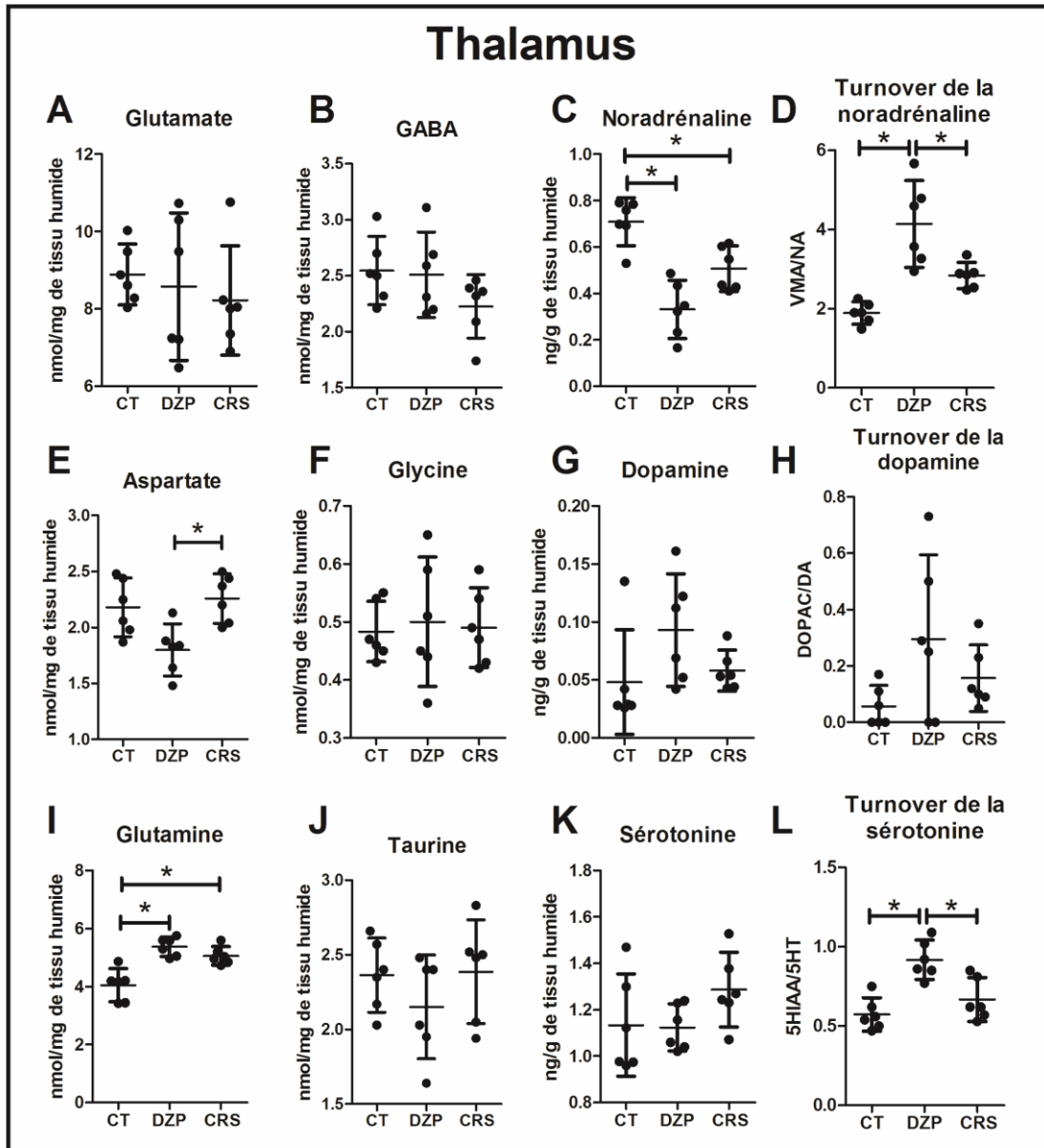
ANOVA e pós-teste Tukey com 10.000 reamostragens bootstrap das concentrações de aminoácidos e monoaminas no tálamo. **VMA** - acide vanillylmandélique ; **NA** - Noradrénaline; **DOPAC** - Acide 3,4-hydroxyphénylacétique ; **DA** - Dopamine; **5-HIAA** - acide 5-hydroxindolacético; **HVA** – acide homovanillique ; **5-HT** - Serotonine; **ASP** - Aspartate; **GLU** - Glutamate; **GLN** - Glutamine; **GLI** - Glycine; **TAU** – Taurine; **GABA** – Acide gamma aminobutyrique .

**Codes** : (\*  $p<0.05$ ) Différence par rapport au groupe CT ; (#  $p<0.05$ ) Différence par rapport au groupe DZP

La quantification des acides aminés indique une augmentation de la concentration de la GLN dans les groupes DZP et CRS par rapport au groupe CT (**Figure 11-I**). Nous observons également une augmentation de la concentration de l'ASP dans le groupe CRS par rapport aux animaux du groupe DZP (**Figure 11-E**).

Concernant les monoamines, les résultats indiquent une diminution de la concentration de la NA dans les groupes DZP et CRS comparativement aux rats des groupes CT (**Figure 11-C**), par contre le taux de turnover de la NA a augmenté dans le groupe DZP comparativement aux groupes CT et CRS (**Figure 11-D**). Concernant la 5-

HT, nous avons observé une augmentation de son taux de turnover dans le groupe DZP par rapport aux rats des groupes CT et CRS (Figure 11-L).



**Figure 11** : Acides aminés et monoamines dans le thalamus: VMA - acide vanillylmandélique ; NA - Noradrénaline; DOPAC - Acide 3,4-hydroxyphénylacétique ; DA - Dopamine; 5-HIAA - acide 5-hydroxyindolacético; HVA – acide homovanillique ; 5-HT - Sérotonine; ASP - Aspartate; GLU - Glutamate; GLN - Glutamine; GLY - Glycine; TAU – Taurine; GABA – Acide gamma aminobutyrique. Codes \*  $p < 0,05$ .

### 4.2.3. Le cortex piriforme

Dans **Tableau 5** nous avons la concentration des acides aminés et monoamines dans le cortex piriforme.

**Tableau 5.** Concentration de monoamines et acides aminés dans le cortex piriforme

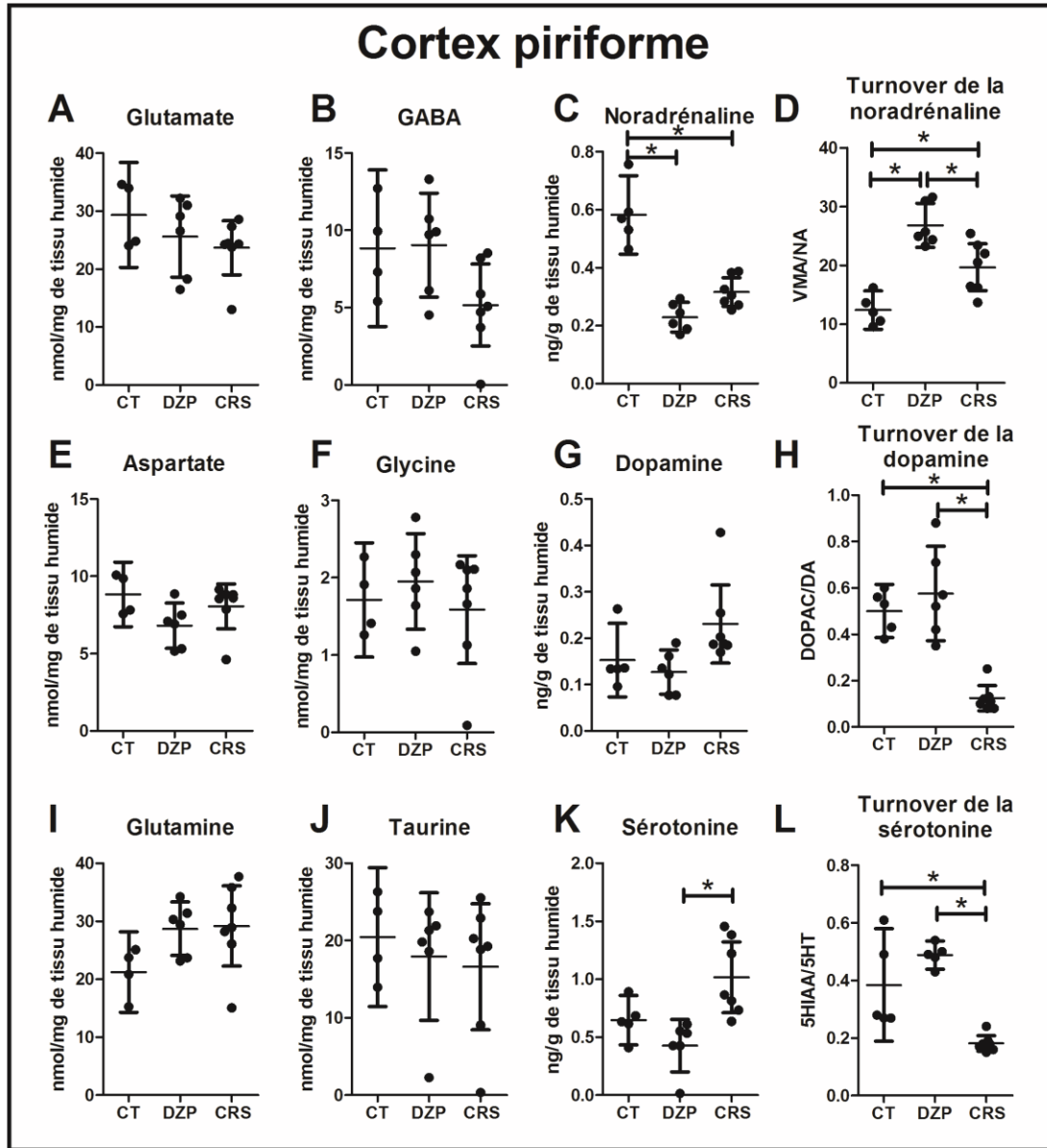
Monoamines	ng/g de tissu			ANOVA	Bootstrap
	CT	DZP	CRS		
NA	0.58	0.23 *	0.32 *	$F_{(2,15)}= 35,88; p<0.001 *$	$p<0.001 *$
VMA	7.02	6.08	6.03	$F_{(2,15)}= 2,67; p=0.101$	$p=0.160$
VMA/NA	12.40	26.82 *	19.67 * #	$F_{(2,15)}= 21,03; p<0.001 *$	$p<0.001 *$
DA	0.15	0.13	0.23	$F_{(2,15)}= 3,73; p=0.048 *$	$p=0.068$
DOPAC	0.07	0.07	0.03 * #	$F_{(2,15)}= 15,12; p<0.001 *$	$p=0.011 *$
DOPAC/DA	0.50	0.57 *	0.12 *	$F_{(2,15)}= 23,35; p<0.001 *$	$p<0.001 *$
HVA	0.05	0.04	0.16	$F_{(2,15)}= 0,71; p=0.504$	$p=0.340$
HVA/DA	0.73	0.55	1.51 #	$F_{(2,15)}= 7,08; p<0.007 *$	$p<0.01 *$
5HT	0.65	0.43	1.01 #	$F_{(2,15)}= 8,58; p=0.003 *$	$p=0.011 *$
5HIAA	0.23	0.26	0.18	$F_{(2,15)}= 4,28; p=0.033 *$	$p=0.077$
5HIAA/5HT	0.38	0.49	0.18 * #	$F_{(2,15)}= 18,61; p<0.001 *$	$p<0.001 *$
<b>Acides aminés</b>	<b>nmol/mg de tissu</b>				
ASP	29.34	25.59	23.66	$F_{(2,14)}= 2,51; p=0.116$	$p=0.129$
GLU	21.22	28.69	29.14	$F_{(2,14)}= 1,21; p=0.326$	$p=0.249$
GLN	1.71	1.95	1.59	$F_{(2,14)}= 2,61; p=0.108$	$p=0.112$
GLI	20.43	17.92	16.59	$F_{(2,14)}= 5,16; p=0.607$	$p=0.409$
TAU	8.84	9.05	5.16	$F_{(2,14)}= 0,30; p=0.744$	$p=0.442$
GABA	8.83	6.81	8.06	$F_{(2,14)}= 3,17; p=0.072$	$p=0.088$

ANOVA et teste post-hoc Tukey avec 10.000 ré-échantillonnage par bootstrap des monoamines et acides aminés dans le cortex piriforme. **VMA** - acide vanillylmandélique ; **NA** - Noradrénaline; **DOPAC** - Acide 3,4-hydroxyphénylacétique ; **DA** - Dopamine; **5-HIAA** - acide 5-hydroxyindolacétique; **HVA** – acide homovanillique ; **5-HT** - Serotonine; **ASP** - Aspartate; **GLU** - Glutamate; **GLN** - Glutamine; **GLI** - Glycine; **TAU** – Taurine; **GABA** – Acide gamma aminobutyrique .

**Codes :** (\*  $p<0.05$ ) Différence par rapport au groupe CT ; (#  $p<0.05$ ) Différence par rapport au groupe DZP

Dans la **Figure 12-C** nous observons que le niveau de la NA est réduit dans les groupes DZP et CRS par rapport au groupe CT. Cependant, le taux de turnover de la NA (VMA/NA) est plus élevé dans les groupes DZP et CRS que dans le groupe CT. Qui plus est, le turnover est moins élevé dans le groupe CRS que dans le groupe DZP (**Figure 12-D**). Les résultats indiquent aussi qu'il n'y a pas eu d'altération dans la concentration de la DA, cependant il y a eu une réduction du taux de turnover de la DA dans le groupe CRS comparativement aux groupes CT et DZP (**Figure 12-H, G**). De plus, nous avons

observé une augmentation de la 5-HT dans les animaux du groupe CRS par rapport au groupe DZP (**Figure 12-K**), avec une réduction du taux de turnover de la 5-HT dans le groupe CRS par rapport aux groupes CT et DZP (**Figure 12-L**).

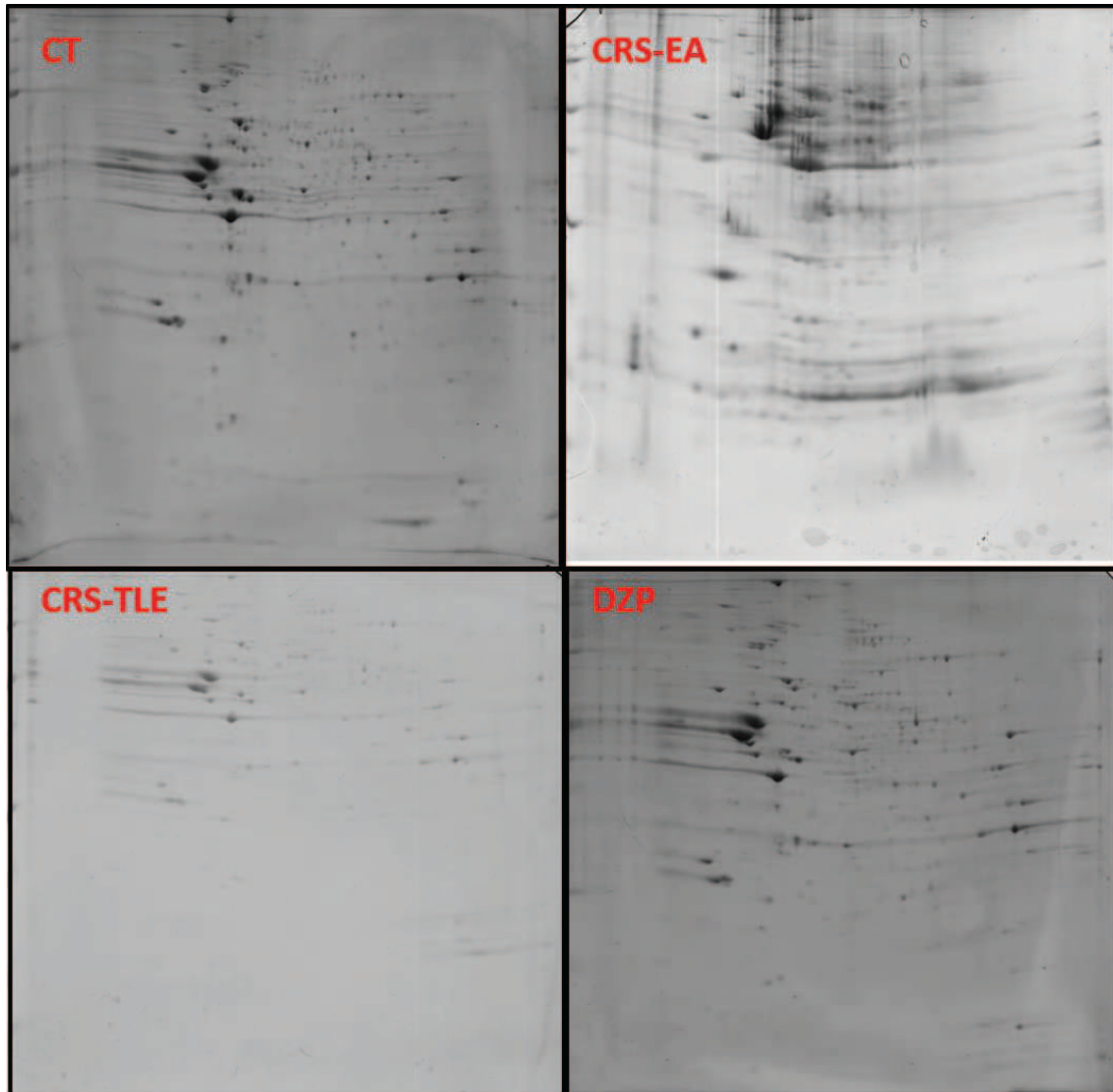


**Figure 12** : Acides aminés et monoamines dans le cortex piriforme: **VMA** - acide vanillylmandélique ; **NA** - Noradrénaline; **DOPAC** - Acide 3,4-hydroxyphénylacétique ; **DA** - Dopamine; **5-HIAA** - acide 5-hydroxindolacético; **HVA** – acide homovanillique ; **5-HT** - Sérotonine; **ASP** - Aspartate; **GLU** - Glutamate; **GLN** - Glutamine; **GLY** - Glycine; **TAU** – Taurine; **GABA** – Acide gamma aminobutyrique. Codes \*  $p < 0,05$ .



### 4.3. Protéomique

La séparation bidimensionnelle des protéines nous a permis l'identification de nombreux spots dans les différents groupes (**Figure 13**). Le **Tableau 6** nous montre les 24 protéines différemment exprimées dans les groupes.



**Figure 13:** Gel de séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle de l'hippocampe des différents groupes.

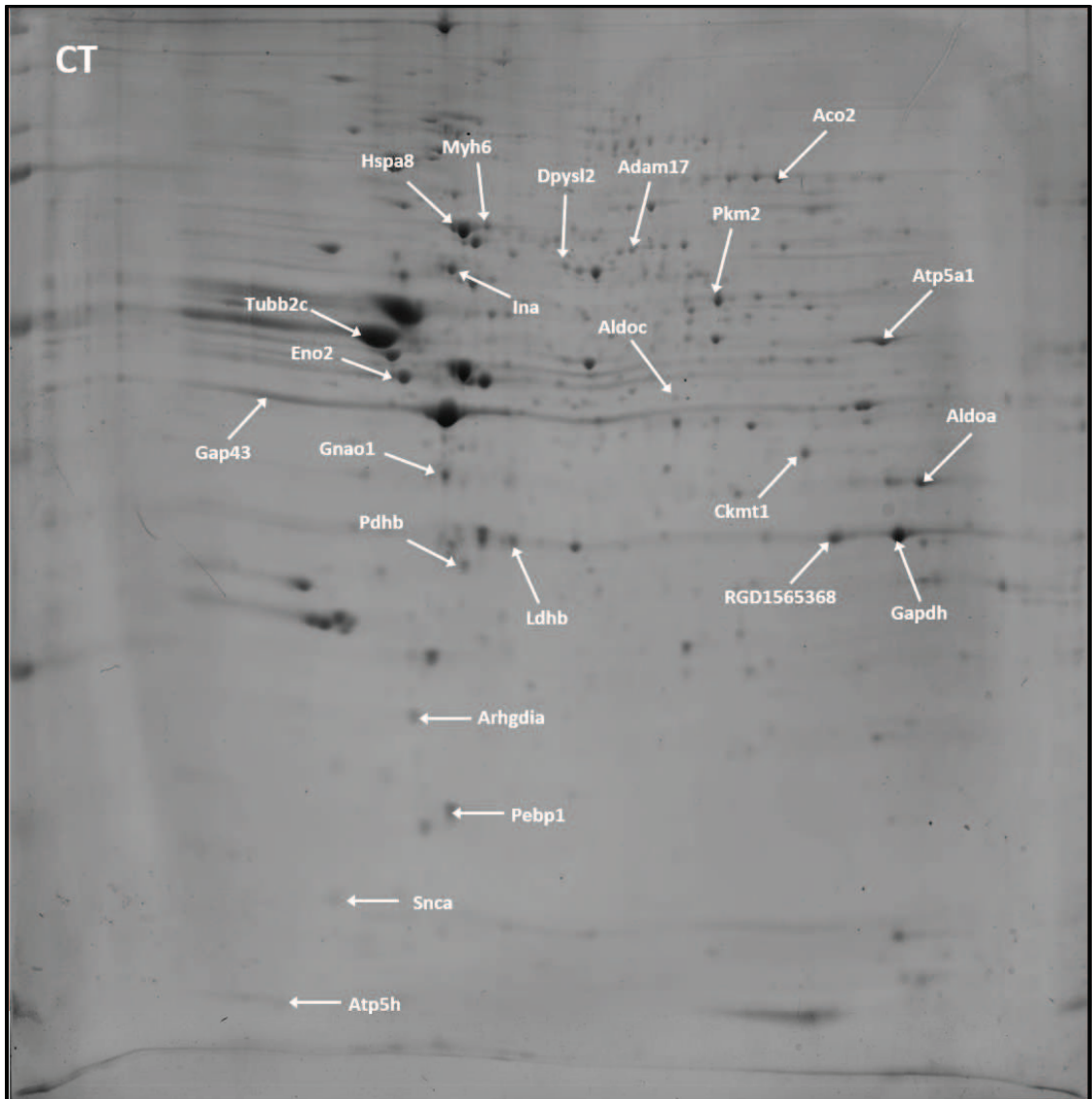
**Tableau 6 :** Protéines différentiellement exprimés dans l'hippocampe des rats.

Protéine	Gène	ID UniProt	CT	Mo
Aconitase	<i>ACO2</i>	Q99798	4936	
ADAM métallopeptidase	<i>Adam17</i>	Q9Z0F8	1378	
Aldolase A	<i>Aldoa</i>	P05065	7537	
Aldolase C	<i>Aldoc</i>	P05063	2136	
Alpha-internexine	<i>Ina</i>	P23565	8882	
Alpha-synucléine	<i>Snca</i>	P37377	4141	
ATP synthase alpha	<i>Atp5a1</i>	P15999	9684	
ATP synthase delta	<i>Atp5d</i>	P35434	2707	
Créatine kinase de type U	<i>Ckmt1</i>	P25809	5151	
Dihydropyrimidinase 2	<i>Dpysl2</i>	P47942	2079	
Enolase 4	<i>Eno4</i>	D3ZRT2	843	
Enolase 2	<i>Eno2</i>	P07323	12747	
Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Similar)	<i>RGD 1565368</i>	P04797	8984	
Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	<i>Gapdh</i>	P04797	21062	
Sous-unité alpha de la protéine de liaison de nucléotide G (i)	<i>Gnai1</i>	P10824	8054	
Protéine de choc thermique cognat 71 kDa	<i>Hspa8</i>	P63018	4763	
Chaîne B de la Lactate déshydrogénase	<i>Ldhb</i>	P42123	7183	
Myosine 6	<i>Myh6</i>	P02563	3063	
Neuromoduline	<i>Gap43</i>	P07936	4202	
Protéine 1 de liaison de phosphatidyléthanolamine	<i>Pebp1</i>	P31044	9292	
Pyruvate déshydrogénase E1	<i>Pdhb</i>	P49432	3930	
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	<i>Pkm</i>	P11980	7605	
Protéine inhibitrice de Rho GDP dissociation	<i>Arhgdia</i>	Q5XI73	2987	
Chaîne beta 2C de la tubuline	<i>Tubb2c</i>	P69897	127231	

Liste des protéines avec la densité optique(DO) moyenne dans les différents groupes. Codes : \* ( $p < 0,05$ ) = différence par rapport au groupe DZP; § ( $p < 0,05$ ) = différence par rapport au groupe CRS-ELT;

L'étude de protéomique a indiqué qu'il y a eu une augmentation des protéines Dpysl2, Hspa8, et une réduction des protéines Gnai1, Pebp1 et Pdhb, dans le groupe DZP par rapport au groupe CT. Nous avons observé également une augmentation des protéines Pdhb et Ldhb, et une réduction des protéines Aco2, Adam17, Aldoa, Atp5a1, Ckmt1, Gapdh, Gnai1, Myh6, Pkm, Arhgdia et Tubb2c, dans le groupe CRS quand comparé au groupe CT. Il y a eu encore une augmentation des protéines Eno2 et Gap43, ainsi qu'une diminution des protéines Ina, Snca, Gnai1, Ldhb et Pebp1 dans le groupe CRS-ELT comparativement au groupe CT. Les résultats indiquent aussi une augmentation des protéines Eno4, Ldhb, Pebp1 et Pdhb, et une réduction des protéines Aco2, Adam17, Aldoa, Aldoc, Atp5a1, Ckmt1, Gapdh, Myh6, Gap43, Pkm, Arhgdia et Tubb2c dans le groupe CRS-EA si comparé au groupe DZP. Nous avons observé également une augmentation de la protéine Eno2, ainsi qu'une réduction de la protéine Ldhb, dans le groupe CRS-ELT comparativement au groupe DZP. Et enfin, il y a eu une augmentation des protéines Snca, Eno4, Ldhb, Pebp1 et Pdhb, ainsi qu'une réduction des protéines Aco2, Adam17, Gapdh, Myh6, Gap43 et Arhgdia dans les rats du groupe CRS-EA par rapport au groupe CRS-ELT.

La **Figure 14** nous avons une représentation des protéines identifiées par le spectromètre de masse.

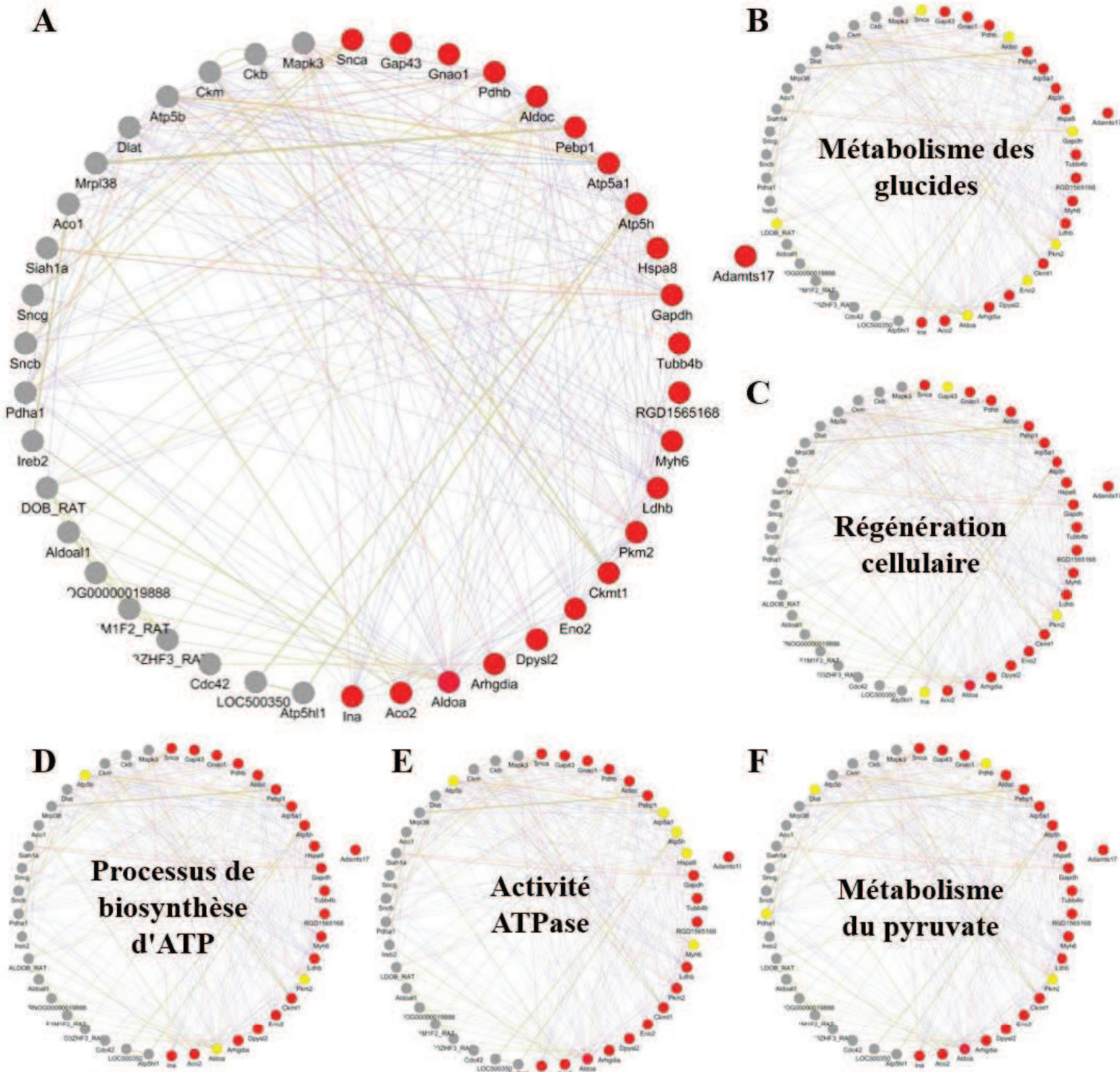


**Figure 14:** Image d'un gel du groupe CT indiquant la position des protéines identifiées.

#### 4.3.1. Interactome

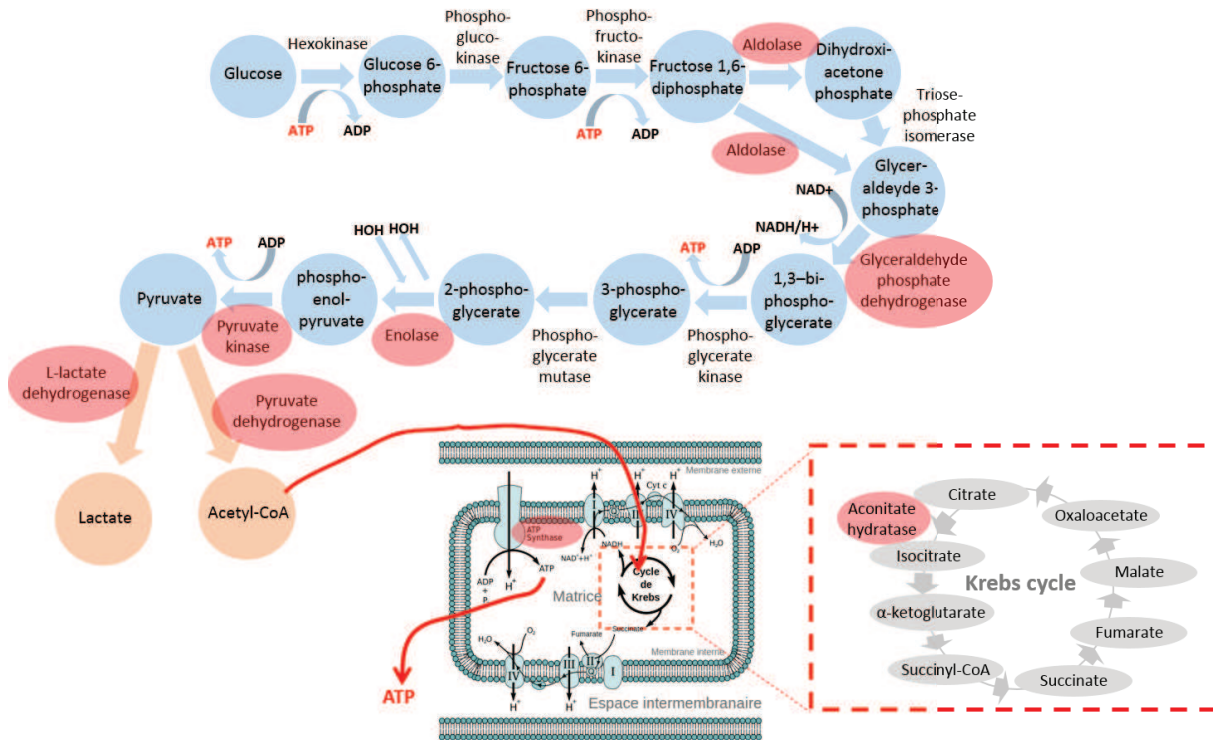
En utilisant le système GENE mania nous avons pu identifier 74 fonctions biologiques liées à nos 24 protéines d'intérêt. Ce système a ajouté également 20 autres protéines qui ont une liaison avec les protéines d'intérêt. Avec les identificateurs GO (GO id) nous avons également utilisé le système QuickGo pour vérifier chacune des fonctions biologiques et pour faire une représentation graphique hiérarchique de ces fonctions biologiques.

Il est clair que le volume des informations obtenues après ces post-analyses est énorme. Par conséquent, nous avons utilisé le logiciel Cytoscape pour réunir toutes ces informations, ce qui nous a facilité l'analyse de l'ensemble des données. La **Figure 15** illustre une des étapes de cette analyse.



**Figure 15:** A) Illustration de l'analyse de l'interactome incluant les 24 protéines d'intérêt (en rouge) et les 20 autres protéines incluent par le système GENEMANIA (en gris), identifiées en jeune nous avons les protéines qui participent au métabolisme des carbohydrates (B), à la régénération cellulaire (C), biosynthèse de ATP (D), activité d'ATPase (E) et métabolisme do pyruvate (F).

L'analyse de l'interactome nous a permis d'observer que 8 des 24 protéines d'intérêt identifiées dans cette étude font partie de la voie glycolytique, du cycle de Krebs et de la respiration cellulaire (**Figure 16**).



**Figure 16:** Représentation schématique de la glycolyse et de la respiration

#### 4.3.2. Confirmation par western blotting

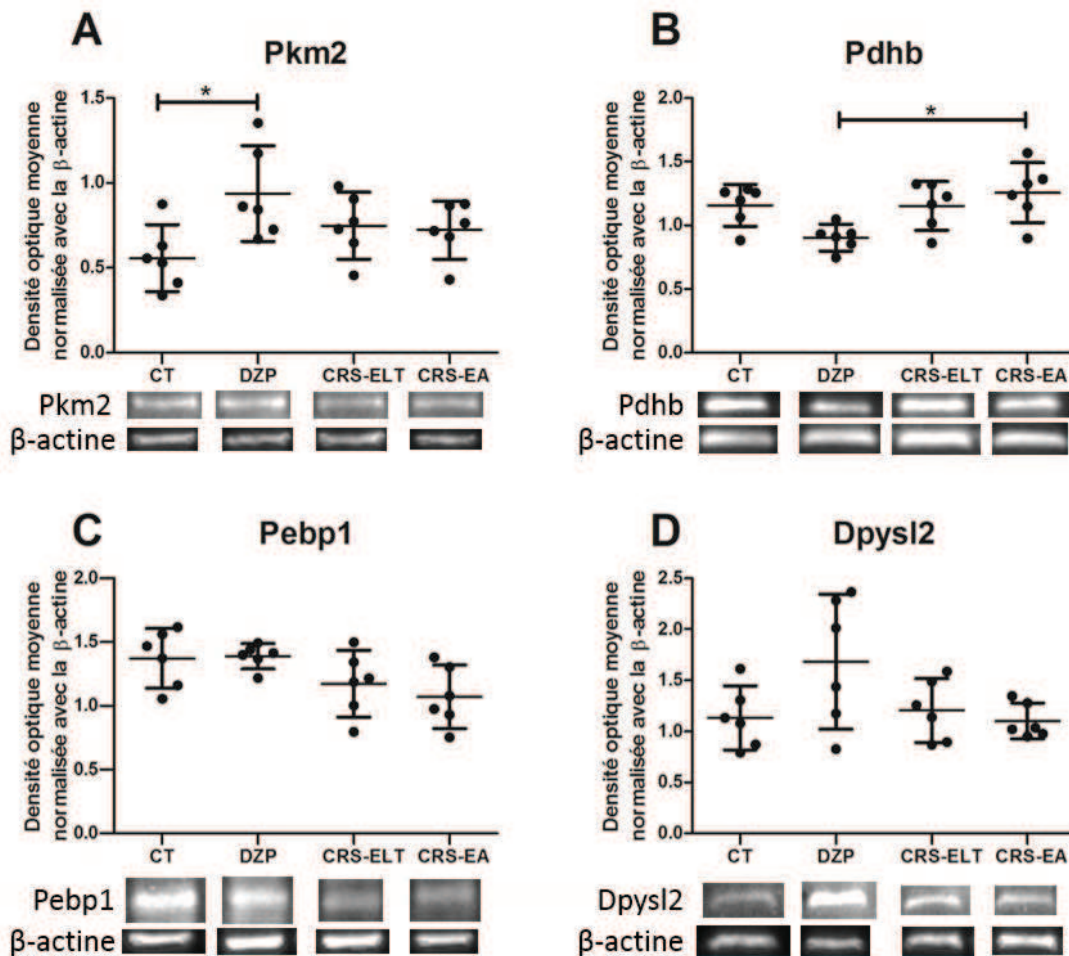
La confirmation de l'expression des protéines Pkm2, Pdhb, Pebp1, et Dpysl2, a été effectuée par western blotting. Les résultats statistiques sont résumés dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7 :** Confirmation de l'expression des protéines Pkm2 ; Pdhb ; Pebp1 ; Dpysl2 par

Protéines	Densité optique (DO)				ANOVA	Valerus de p par bootstrap
	CT	DZP	CRS-ELT	CRS-EA		
Pkm2	0.556	0.937 *	0.748	0.722	$F_{(3,20)} = 3,46; p = 0.035 *$	$p = 0.049 *$
Pdhb	1.157	0.904	1.152	1.257 #	$F_{(3,20)} = 4,57; p = 0.013 *$	$p = 0.018 *$
Pebp1	1.372	1.388	1.173	1.071	$F_{(3,20)} = 3,28; p = 0.042 *$	$p = 0.051$
Dpysl2	1.132	1.683	1.205	1.101	$F_{(3,20)} = 2,94; p = 0.057$	$p = 0.124$

ANOVA et teste post-hoc Tukey avec 10.000 rééchantillonnage par bootstrap. **Pkm2** – Pyruvate kinase M1/M2 ; **Pdhb** - Pyruvate déshydrogénase E1; **Pebp1**- Phosphatidyléthanolamine-binding protein 1; **Dpysl2** – Dihydropyrimidinase-2. Codes : (\*  $p < 0,05$ ) différence par rapport au groupe CT; (#  $p < 0,05$ ) différence par rapport au groupe DZP :

Comme nous pouvons observer dans la **Figure 17-A** la protéine Pkm2 a augmenté de manière significative chez les animaux du groupe DZP par rapport au groupe CT. Cette augmentation n'a pas été vérifiée dans le groupe traité avec du carisbamate. La **Figure 17-B** indique que les taux de la protéine Pdhb sont plus élevés chez les animaux du groupe CRS-EA comparés au groupe DZP. L'analyse des protéines Pebp1 et Dpysl2 n'ont pas montrées des différences statistiques entre les groupes (**Figure 17-C, D**).



**Figure 17** : Quantification des protéines Pkm2, Pdhb, Pebp1 et Dpysl2 par western blotting.

## **Discussion**



## 5. DISCUSSION

En dépit des innombrables travaux faits et des progrès réalisés durant les dernières décennies, nous comptons encore à peu près 30 % de personnes avec un diagnostic d'ELT présentant des crises réfractaires au traitement pharmacologique. Dans ces cas, l'ablation chirurgicale du foyer épileptique est toujours la forme la plus utilisée pour contrôler les crises (Moshé et al., 2015).

Malgré les résultats non concluants des essais cliniques, commentés dans l'introduction de cette thèse, les effets les plus significatifs et intéressants liés à l'administration du carisbamate dans les études précliniques ont été obtenus avec des administrations durant la période aigüe du modèle Li-Pilo, suivies de deux administrations journalières pendant 7 jours (François et al., 2011). En outre, nous pouvons observer une neuroprotection significative des structures clefs pour l'ELT (François et al., 2011). Le carisbamate est la première molécule déjà étudiée à provoquer une altération efficace du processus d'épileptogénèse, car environ la moitié des animaux traités par le carisbamate (durant 7 jours, avec deux doses quotidiennes, commençant 1 heure après le début du SE) développent des crises d'absences au lieu des crises limbiques normalement observées dans le modèle Li-Pilo. Ce résultat mérite être l'objet d'études plus approfondies.

Dans ce travail, nous avons eu pour objectif d'évaluer, par des techniques spécifiques, les altérations neurochimiques, immunohistochimiques et l'expression protéique, dans le cerveau des rats soumis au modèle Li-Pilo, traités par le carisbamate et qui ont développé des crises limbiques ou d'absence. Les données seront discutées ci-dessous.

### **5.1. Altération dans l'activité cérébrale**

Pour obtenir une cartographie de l'activité neuronale dans diverses régions cérébrales après le SE, nous avons effectué un immunomarquage de la protéine du gène précoce c-Fos, entre 3 et 4 heures après le début du SE. Le choix de ce délai a été basé sur une étude précédente qui a mis en évidence, au moyen d'enregistrements électrographiques, que dans cette période les animaux traités par le carisbamate qui ne développent pas de crises limbiques présentent une réduction significative de l'activité épileptiforme par rapport aux animaux qui développent des crises limbiques, qu'ils aient été traités ou non par le carisbamate (François et al., 2011).

Par rapport à l'expression basale de c-Fos trouvée chez les rats du groupe CT, les animaux qui ont été soumis au SE présentent une augmentation de l'activité dans toutes les régions du lobe temporal, ainsi que dans quelques noyaux du thalamus. La comparaison entre les groupes CRS et DZP est essentielle pour vérifier si le traitement par le carisbamate a affecté l'activité de ces régions critiques des circuits impliqués dans l'ELT. Cette comparaison nous a révélé que le traitement n'a pas modifié significativement l'activité dans la formation hippocampique (GD, CA1 et CA3), dans l'amygdale ou les cortex entorhinal et piriforme, régions qui sont directement liées aux crises limbiques. Les seules différences observées se retrouvent au niveau du thalamus, avec une augmentation de l'activité dans les noyaux MD et LD chez les animaux traités par le carisbamate. Toutefois il est important de souligner que le marquage de la protéine c-Fos ne révèle que les cellules activées et qu'il est impossible de déterminer la nature de cette activation (excitatrice/inhibitrice).

Ces noyaux thalamiques possèdent d'importants rôles tant dans l'ELT que dans l'épilepsie absence. En outre, il est intéressant de noter qu'en dépit du fait que nous n'ayons pas observé de différence dans l'activité de l'hippocampe, l'analyse factorielle a

indiqué que les animaux qui ont une activation plus importante dans les noyaux MD et LD du thalamus ont une activation moins importantes des cellules du GD. Toutefois, cette observation ne signifie pas nécessairement de liaison directe entre ces structures, car nous savons que les efférences du GD viennent principalement du cortex entorhinal (Ramón y Cajal S., 1893). Cependant, ce pattern d'activité peut suggérer une relation indirecte entre ces régions. En outre nous observons également que les animaux qui présentent une plus grande activité du MD et du LD présentent aussi une augmentation de l'activité dans le complexe VB du thalamus. Ce complexe, conjointement au NRT et au cortex sensorimoteur, est une région critique dans la circuiterie de l'épilepsie absence (Danober et al., 1998; Pinault, 2004).

Cette augmentation de l'activité des noyaux MD et LD du thalamus peut être apparentée au rôle modulateur que ces noyaux thalamiques possèdent dans le contrôle des crises épileptiques, tant des crises limbiques que d'absences. Certains noyaux thalamiques sont impliqués dans le processus d'épileptogénèse et dans la modulation des crises limbiques (Bertram et al., 2001, 2008; Sloan et Bertram, 2009; Sloan et al., 2011a, 2011b), impliquant principalement les noyaux de la ligne médiane du thalamus (en incluant les noyaux Re, Ro et MD) (Bertram et al., 2001). Bertram et ses collaborateurs (1998) ont observé que le thalamus est impliqué dans l'activité physiologique associée aux crises durant le SE, permettant la synchronisation entre l'activité épileptiforme dans le thalamus et l'hippocampe. De manière similaire, chez les rats épileptiques chroniques, les perturbations électrographiques signant le début des crises apparaissent de façon simultanée dans l'hippocampe et dans les noyaux médians du thalamus (Bertram et al., 2001). Des études montrent aussi que l'inhibition du MD favorise l'inhibition des crises limbiques (Bertram et al., 2001; Patel et al., 1988), et que la stimulation électrique du MD induit des crises qui se généralisent plus rapidement que les crises provoquées par la

stimulation électrique de l'hippocampe ou de l'amygdale (Bertram et al., 2008). Ces données suggèrent une participation importante du noyau MD du thalamus, dans la génération, la généralisation et dans la modulation des crises limbiques. Cependant, il est intéressant de noter que dans une étude réalisée par (Cassidy et Gale, 1998), l'administration intra-thalamique de muscimol (agoniste GABAergique) a supprimé complètement les crises limbiques quand il a été administré dans la portion centrale du noyau MC (MDc) alors qu'il est resté sans effet sur les crises limbiques quand il a été administré plus latéralement (MDl) (Cassidy et Gale, 1998). Ceci suggère que le MD peut exercer différents rôles, pouvant générer, moduler et généraliser des crises limbiques, selon la sous-région de ce noyau qui est activée.

Des études dans des modèles animaux d'épilepsie absence, suggère également un rôle important du noyau MD du thalamus dans la genèse des DPO. Des lésions bilatérales du noyau MD sont capables de supprimer complètement les DPO (Banerjee et Snead, 1994). Kato et ses collaborateurs (2008) ont observé que l'administration unilatérale d'acide kaïnique dans le noyau MD a provoqué l'apparition de DPO, qui sont propagées aux autres noyaux du thalamus, au cortex, ainsi qu'aux régions limbiques. Dans cette même étude il a été observé que les DPO étaient accompagnées d'un « freezing » comportemental (Kato et al., 2008).

Ainsi, l'augmentation d'activité observée dans le noyau MD des animaux traités par le carisbamate peut être directement liée à l'effet modificateur de l'épileptogénèse du carisbamate. Également, le rôle que cette structure joue sur les deux types d'épilepsie indique que le MD est une région-clé de l'action du carisbamate.

## 5.2. Monoamines et acides aminés

Nos résultats concernant les monoamines indiquent une réduction de la NA et de la DA chez les animaux Li-Pilo traités par le DZP, durant la période aigüe du modèle. Les animaux traités par carisbamate ont présenté une normalisation des concentrations de DA et NA, car il n'y a plus de différence significative par rapport au groupe CT. Par contre, il n'y a pas eu d'altérations des concentrations de la 5-HT chez les animaux traités par le DZP comparés aux animaux CT. Cependant, nous avons observé une augmentation significative de la 5-HT dans l'hippocampe des animaux traités par le carisbamate. Il est intéressant de souligner que Shim et collaborateurs (2013) ont observé que l'administration de carisbamate durant 14 jours a induit une réduction de décharges de la zone tegmentale ventrale (noyau dopaminergique), du locus coeruleus (noyau noradrénergique), et du noyau dorsal du raphé (noyau sérotoninergique). Dans le noyau dorsal du raphé, il y a eu une réduction des décharges même quand le carisbamate a été administré seulement pendant 2 jours. La réduction des décharges du système dopaminergique (Shim et al., 2013), qui peut être lié à la normalisation des concentrations de DA observée chez les animaux traités par le carisbamate. Malgré la réduction du taux de décharge des neurones du noyau dorsal du raphé observé par Shim et collaborateurs (2013), les taux de 5-HT augmentent dans l'hippocampe ce qui est en accord avec l'augmentation du 5-HT observée dans cette thèse. En outre, il a été rapporté que le carisbamate induit une augmentation de l'activation tonique du récepteur sérotoninergique 5-HT<sub>1A</sub>, augmentant à son tour l'action inhibitrice exercée par le système sérotoninergique sur les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Shim et al., 2013). En plus des altérations observées dans l'hippocampe, nous avons observé dans le thalamus une normalisation des taux de turnover de la NA et la 5-HT. Dans le cortex piriforme la concentration de 5-HT était augmentée et son turnover réduit chez les

animaux traités par le carisbamate. Les taux de turnover de la NA et de la DA sont réduits chez les animaux traités par le carisbamate comparés aux animaux DZP.

Dans le modèle d'ELT induit par la pilocarpine, une réduction des concentrations de NA accompagnée d'une augmentation du taux d'utilisation de NA durant la période aigüe, latente (7 jours après le SE) et chronique ont été rapportés (Fernandes et al., 1994; Cavalheiro et al., 1994). Au contraire, une augmentation des concentrations et une réduction du taux d'utilisation de la DA dans les trois périodes du modèle pilocarpine (Fernandes et al., 1994; Cavalheiro et al., 1994). Une augmentation des concentrations de sérotonine a été rapportée seulement pendant la période aigüe du modèle pilocarpine, avec toutefois une augmentation de son taux d'utilisation au cours des périodes aigüe et latente, sans aucune altération durant la période chronique (Fernandes et al., 1994; Cavalheiro et al., 1994)).

Des études précédentes ont démontré le rôle des monoamines dans l'ELT. La lésion des neurones noradrénergiques facilite le développement des crises induites par l'embrassement de l'amygdale (Corcoran et al., 1974). La 5-HT possède aussi des effets inhibiteurs des crises limbiques générées par embrassement (Cavalheiro et al., 1981; Racine et Coscina, 1979).

Ainsi, la normalisation observe des systèmes noradrenergique et dopaminergique, ainsi que l'augmentation de la concentration de 5-HT chez les animaux traité avec le carisbamate, peut être liée à la significative neuroprotection obtenue par le carisbamate.

Nos résultats montrent également une augmentation de la GLN et du GABA dans l'hippocampe des animaux Li-Pilo traités par le DZP durant la période aigüe du modèle. Cependant, il n'y a pas eu d'altérations du niveau du GLU chez les animaux traités par DZP comparés aux animaux CT. Les animaux traités par le carisbamate ont présenté également une normalisation des concentrations de GABA, puisque ceux-ci ne différaient

pas des animaux CT. Nous avons observé également une augmentation de la concentration d'ASP dans l'hippocampe des animaux du groupe CRS par rapport au groupe DZP. Les concentrations de GLN étaient augmentées chez les animaux CRS et DZP comparés aux animaux CT. De plus, l'effet du carisbamate ne se limite pas à l'hippocampe, dans le thalamus nous avons observé une normalisation de l'ASP chez les animaux CRS par rapport aux animaux du groupe CT, et une réduction de l'ASP dans le groupe DZP comparé au groupe CRS. Cependant, dans le cortex piriforme il n'y a pas eu de différence significative des concentrations des acides aminés entre les différents groupes.

Dans le modèle de la pilocarpine, les concentrations de GLU et d'ASP sont réduits et ceux du GABA et de la GLN sont augmentés 5 heures après le début du SE induit par la pilocarpine seule (Cavalheiro et al., 1994). De plus, les acides aminés GABA, GLY et TAU, sont connus pour exercer un effet inhibiteur dans le système nerveux. D'un autre côté, tant le GLU que le ASP sont des ligands endogènes des récepteurs excitateurs (Wagner et al., 1991).

De plus, les acides aminés GLN, GLU et GABA participent au cycle GLN-GLU-GABA. Ce cycle, qui s'initie avec la GLN produite par la glycolyse, aussi dans les astrocytes comme dans les neurones, et que suit un flux de GLN des astrocytes vers les neurones (Hertz, 2013). Dans les neurones la GLN est converti en GLU et celui en GABA. Après la libération de ces neurotransmetteurs dans la fente synaptique, une grande partie est transportée en retour vers les astrocytes où ils sont reconvertis en GLN (Hertz, 2013). Ainsi, les résultats suggèrent que la GLN, qui est augmenté dans les deux groupes soumis au SE, peut être liée à l'augmentation du GABA dans le groupe DZP, mais non dans le groupe CRS, où la concentration de GABA est similaire à celle des animaux CT. Cependant, le processus de mort neuronale causé par le SE, peut causer l'élévation de la

concentration d'ammoniac, que par conséquent peut être converti en GN par l'interaction avec le GLU avec l'action de la glutamine synthétase, comme un processus de défense.

En résumé, l'application du carisbamate 1h après le début du SE, a pour conséquence une normalisation globale des concentrations de la DA, la NA et du GABA et une augmentation des concentrations de la 5-HT et de l'ASP dans l'hippocampe. L'augmentation de la concentration du GABA et du taux de turnover de la NA dans les animaux du groupe DZP peut suggérer un mécanisme compensatoire inhibiteur, ce que n'est pas observé dans le groupe CRS, indiquant une réduction de l'intensité des crises par le carisbamate. Ces altérations pourraient sous-tendre l'effet significatif de neuroprotection obtenu par l'administration de carisbamate, car elles pourraient permettre de régulariser la balance excitatrice/inhibitrice cérébrale mais cette hypothèse reste à démontrer.

### **5.3. Étude du profil protéique du modèle Li-Pilo**

Un des principaux objectifs de cette étude a été celui de déterminer les altérations de l'expression des protéines chez les animaux soumis au Li-Pilo, et traités ou non par le carisbamate. Dans cette étude il nous a été possible d'obtenir un groupe de rats soumis au SE, traités par du carisbamate et qui ont développé des crises d'absence au cours de la période chronique, et un deuxième groupe qui a développé des crises limbiques. Ces deux sous-populations ont été comparés avec les rats traités par du diazepam au lieu du carisbamate, et avec des rats CT. Ces données devraient nous fournir des pistes sur les mécanismes liés à l'effet modificateur du carisbamate sur la pathologie épileptique.

Aujourd'hui, le nombre d'études basées sur la protéomique est croissant dans l'objectif d'identifier les marqueurs biologiques liés à l'épilepsie (Alzate, 2010;



Fernandes et al., 2013; Liu et al., 2010; Pitkänen et Lukasiuk, 2011). Les études ont été réalisées sur de personnes souffrant d'ELT qui ont été soumises à une ablation chirurgicale de l'hippocampe (He et al., 2006; Mériaux et al., 2014) et dans des modèles animaux d'ELT (Heverin et al., 2012; Wu et al., 2011). Cette technique nous donne une vision générale des altérations de l'expression des diverses protéines qui peuvent être liées, directement ou indirectement, aux crises épileptiques.

Dans cette thèse nous avons trouvé un total de 24 protéines exprimées différemment, augmentés (Aco2, Aldoa, Dpysl2, Hspa8, Gap43, Pkm2 e Tubb2c) ou réduites (Ina, Snca, Eno4, Gnai1, Pebp1 e Pdhb) dans les animaux présentant des crises limbiques. Parmi ces protéines, 8 sont liées au métabolisme et au processus de respiration cellulaire. Les autres protéines sont liées à d'autres processus comme le développement et la plasticité neuronale, et les processus inflammatoires, entre autres.

#### *Processus métaboliques et respiration cellulaire.*

Les résultats obtenus dans ce travail indiquent une réduction globale des protéines liées à la glycolyse (Aldoa, Gapdh et Pkm2) et à la respiration cellulaire (Aco2 et Atp5h) et une augmentation des protéines liées au métabolisme du pyruvate (Pdhb et Ldhb) dans le groupe CRS-EA.

Le processus métabolique est un processus durant lequel des molécules consommées pendant l'alimentation sont oxydées via des processus endogènes. Les processus du métabolisme énergétique peuvent être classés en deux groupes selon qu'ils ont lieu à partir de glucides ou de lipides (Connolly et Prehn, 2014). Au niveau du métabolisme des glucides, la glycolyse est la principale forme de production d'énergie. Celle-ci est une importante source d'énergie pour toutes les cellules et elle est essentielle pour le cerveau et pour les globules rouges (Connolly et Prehn, 2014). L'utilisation de la

glycolyse pour la production d'énergie commence par l'absorption et la conversion du glucose en glycose-6-phosphate (G-6P) (Connolly et Prehn, 2014). Au total, la glycolyse comporte une séquence de 10 réactions (**Figura 14**) menant à la formation de pyruvate.

Les résultats obtenus dans ce travail indiquent qu'il y a eu une réduction significative de trois enzymes qui catalysent cette voie : l'Aldoa qui transforme le D-fructose 1,6-bisphosphate en dihydroxyacetone Phosphate + D-glycéraldéhyde 3-phosphate ; le Gapdh qui est la protéine responsable de la transformation du D-glycéraldéhyde 3-Phosphate + orthophosphate + NAD<sup>+</sup> en 1,3-bisphospho-D-glycérate + NADH + H<sup>+</sup> ; et de la Pkm2 qui catalyse la transformation de phosphoénol Pyruvate+ ADP en Pyruvate+ ATP.

Le pyruvate, produit final de la glycolyse, est métabolisé et son métabolite, l'acétylCoA entre dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA ou Cycle de Krebs). Cette réaction est médiée par le complexe catalytique Pyruvate déshydrogénase (PDH) qui, après avoir accéléré le processus de décarboxylation oxydative du Pyruvate, transforme le Pyruvate + CoASH + NAD<sup>+</sup> en acétylCoA + CO<sub>2</sub> + NADH + H<sup>+</sup>, l'acétylCoA étant ensuite utilisé dans le Cycle de Krebs. La sous-unité alfa E1 (Pdhb) est responsable de l'activation/désactivation du complexe PDH (Arjunan et al., 2002). En effet, elle est activée après être déphosphorylée par la protéine pyruvate déshydrogénase et désactivée après être phosphorylée par le pyruvate déshydrogénase kinase (Okajima et al., 2008). Ainsi la protéine Pdhb est une étape importante qui lie la glycolyse au Cycle de Krebs. Une seconde voie métabolique du pyruvate est la transformation du pyruvate en lactate (LDH) qui transforme le lactate en pyruvate et agit de manière bidirectionnelle. Dans la présente étude nous avons observé une augmentation des deux enzymes catalytiques de cette voie (PDH et LDH). Cependant, en prenant en considération que, globalement, la glycolyse se trouve réduite chez les animaux du groupe CRS-EA (par rapport au groupe

DZP), l'augmentation de ces enzymes catalytiques peut être un effet compensatoire face à une baisse considérable de l'expression du pyruvate.

Après l'entrée de l'acétylCoA dans le cycle de Krebs, ce dernier est transformé en Citrate, qui est ensuite transformé en Isocitrate par l'aconitase. Ainsi la réduction de l'Aco2 que nous avons observée dans le groupe CRS-EA peut indiquer une diminution de la transformation du Citrate en Isocitrate et, conséquemment, les concentrations de NADH<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> et GTP.

Les NADH<sup>+</sup> formés durant la Glycolyse et durant le Cycle de Krebs, transfèrent les électrons qu'ils transportent aux cytochromes, qui sont des protéines transporteuses d'électrons (Mailloux, 2015). Au long de la chaîne respiratoire au fur et à mesure que les électrons passent d'un transporteur à un autre, a lieu la libération graduelle d'énergie (Mailloux, 2015). Cette énergie libérée est utilisée dans la synthèse des molécules d'ATP, à partir d'ADP+Pi. Pour chaque molécule de NADH<sup>+</sup> nous avons la synthèse de trois molécules d'ATP. L'ATPase ou complexe V mitochondrial, est responsable de la formation d'ATP par le moyen de l'accouplement chimiosmotique. Elle est responsable de la dernière étape de la chaîne respiratoire, en synthétisant l'ATP à partir de la combinaison d'une molécule d'ADP avec une de Pi (Mailloux, 2015). La réduction observée du niveau de l'Atp5h dans le groupe CRS-EA par rapport au groupe DZP peut affecter de manière significative la production de l'ATP.

De manière générale, les résultats de ce travail indiquent que les animaux du groupe CRS-EA présentent une réduction globale de la glycolyse, ainsi que des enzymes de synthèse de l'ATP. Ces altérations indiquent une réduction de la production d'ATP et par conséquent de l'excitabilité neuronale. Dans l'épilepsie, la réduction de la production d'énergie cellulaire peut être considérée comme un facteur bénéfique, pouvant prévenir le développement de crises limbiques. Car une baisse du niveau énergétique cellulaire se

traduit, entre autres, par une réduction de l'excitabilité neuronale puisqu'en altérant le cycle de Krebs nous agissons aussi sur la synthèse de GLU, GABA et ASP (Fernie et al., 2004).

En plus des protéines liées au processus métabolique et de production d'ATP, des molécules qui jouent un rôle dans d'autres voies ont été aussi altérées dans le groupe CRS-EA par rapport au groupe DZP.

*Protéine de choc thermique 71 (Hspa8) :*

Nous avons observé une augmentation du Hspa8 dans le groupe DZP. Cependant, dans les deux sous-populations de rats traitées par du carisbamate les taux de la Hspa8 étaient similaires à ceux du groupe CT. La Hspa8 possède un rôle important dans la réponse au stress provoqué par des altérations de température (d'où son nom). La protéine HSF1 existe comme un monomère inactif généralement associé avec Hsp40/Hsp70 et Hsp90 (Ahn et al., 2005). La capacité de réponse de HSF1 au stress cellulaire est contrôlée par la sous-expression de molécules chaperonnes (Ahn et al., 2005). Après une situation de stress, avec une augmentation de température, le HSF1 est libéré de son complexe et se trimérise (Ahn et al., 2005). Le HSF1 est alors transporté vers le noyau, où il est hyperphosphorylé et se lie à l'ADN qui contient des éléments de choc thermique (Ahn et al., 2005). Le Hspa8 possède également un rôle dans le métabolisme de l'ARN et dans l'expression génique. Quand la protéine AUF1 est liée à un ARN, elle forme un complexe avec d'autres protéines incluant le facteur d'allongement eIF4G, une protéine de liaison à poly-PABP, Hsc70 et Hsp27 (Gratacós et Brewer, 2010). Ainsi, Hspa8 peut affecter le processus de dégradation d'ARN messagers en agissant sur AUF1.

Dans le guidage axonal par le Hspa8 joue également un rôle. Quand la protéine CHL1 (une protéine d'adhésion cellulaire) s'accumule dans la membrane pré-synaptique elle recrute Hspa8, d'une façon dépendante de l'ADP (Andreyeva et al., 2010). L'Hspa8 interagit alors avec le domaine intracellulaire de CHL1. Après l'activation de la synapse, CHL1 ainsi que Hspa8 sont internalisés et dirigés vers les vésicules synaptiques (Andreyeva et al., 2010). Dans les synapses, le Hspa8 régule la décapsulation des vésicules synaptiques par la voie de la recapture dépendante de la clathrine (Leshchyn'ska et al., 2006). En réalité, le Hspa8 possède un rôle dans la biogénèse des vésicules membranaires. Elle est responsable, avec la protéine Auxilin, du démantèlement de la protéine Clathrine par le moyen d'une réaction dépendante de l'ATP. C'est l'étape finale pour permettre de libérer la vésicule (Leshchyn'ska et al., 2006). Ainsi, Hspa8 joue aussi un rôle dans la libération de GABA dans la fente synaptique puisqu'il est libéré par un transporteur vésiculaire dépendant de la clathrine.

Ainsi, le fait que l'Hspa8 soit augmenté dans le groupe DZP pourrait avoir un impact sur l'expression génique des rats épileptiques, mais aussi dans la libération du GABA. Cependant plus d'études sont nécessaires pour une meilleure compréhension de l'impact de ces changements dans le cadre de l'épilepsie.

#### *ADAM métallopeptidase 17 (Adam17) :*

Nous avons observé une diminution de la protéine Adam17 dans le groupe CRS-EA par rapport au groupe CT. L'Adam17, aussi appelée TACE (TNF-alpha-converting enzyme), sert de médiateur pour le clivage de TNF-alpha en générant une forme soluble de 17kDa (Robertshaw et Brennan, 2005). En outre, cette protéine a un rôle dans la transduction du signal. La transduction du signal est un processus par lequel les signaux extracellulaires peuvent provoquer des altérations dans l'état et l'activité des cellules. La

stimulation des récepteurs transmembranaires conduisent à une altération conformationnelle qui propage le signal vers le milieu intracellulaire par l'activation des certaines cascades de signalisation. En fonction du contexte cellulaire, cela peut avoir un impact sur la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. L'Adam17 peut interagir avec les facteurs de croissances EGRF, NGF, ARBB4 et NOTCH (Kenchappa et al., 2010; Murthy et al., 2012; Wei et al., 2015). En outre l'ADAM17 est responsable du clivage de l'hormone de croissance GH (Loesch et al., 2006). Ainsi, la diminution observée de l'Adam17 peut avoir un impact négatif sur la neurogenèse qui a lieu après l'agression initiale dans le modèle Li-Pilo. Cependant des études plus approfondies sont nécessaire pour vérifier et mieux comprendre l'impact que ces changements pourraient avoir dans le cadre épileptique.

#### *Dihydropyrimidinase 2 (Dpysl2) :*

L'étude protéomique réalisée dans cette thèse a indiqué une augmentation de la protéine Dpysl2 dans les deux groupes présentant des crises limbiques, mais pas chez les rats traités par le carisbamate et qui ont développé des crises d'absence. Ainsi que l'ADAM17, la protéine Dpysl2 possède un rôle essentiel dans le développement et la polarité neuronale, dans la croissance et le guidage axonal ainsi que dans la migration neuronale (Morimura et al., 2013). C'est une protéine nécessaire à la signalisation des sémaphorines de classe 3 (Morimura et al., 2013). De cette façon, l'augmentation de l'expression de cette protéine dans l'hippocampe des animaux qui présentent des crises limbiques peut être liée à la neurogenèse et la réorganisation synaptique qui font partie des changements décrits dans le cadre de l'ELT. Cependant, les données de notre étude ne permettent pas de définir les altérations de la polarité, de la croissance et de la

migration neuronale, c'est pourquoi de futures études sont nécessaires pour élucider cette question.

#### *Tubulin Beta 2C (Tubb2c) :*

Dans notre travail nous avons observé une augmentation de la protéine Tubb2c chez les animaux du groupe DZP et une réduction de celle-ci dans les groupes CRS-ELT et CRS-EA. Les tubulines sont les protéines les plus nombreuses dans les microtubules. La Tubb2c possède un rôle important dans le repliement des protéines, un processus dans lequel une protéine assume une conformation fonctionnelle. Cette protéine agit sur la protéine L1 qui est une molécule d'adhésion des cellules neuronales. Elle agit aussi sur le transport axonal des vésicules et sur le transport de Glut4 (Liu et al., 2003). Les études sur les modèles animaux d'épilepsie et sur le tissu humain provenant de patients épileptiques ont montré que les crises épileptiques peuvent modifier l'expression des protéines du cytosquelette. En outre, une étude récente a associé une altération du gène Tubb2c chez les patients souffrant d'épilepsie précoce (Cushion et al., 2014). On a également observé une augmentation du Glut4 chez les Wistar audiogènes (Pereira et al., 2008).

#### **5.4. Relation entre l'ELT et l'épilepsie absence**

L'effet modificateur de l'épilepsie par le carisbamate indique qu'il peut y avoir des voies communes aux deux formes d'épilepsies, l'ELT et l'absence. Des études ont montré que les deux modèles animaux les plus utilisés de l'épilepsie absence, le GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg) et le Wag/Rij (Wistar Albino Rat, Glaxo rats from Rijwijk) présentent une résistance au développement de crises limbiques

après l'embrassement de l'amygdale (Eşkazan et al., 2002) et du cortex perirhinal (Akman et al., 2010), en plus de l'augmentation de la latence pour le développement des crises récurrentes chez le modèle Li-Pilo (Hanaya et al., 2008). De la même manière, après le SE induit par l'application de l'acide kainique, la latence d'apparition de la première crise limbique a également été plus grande chez les GAERS que chez les rats Wistars (Gurbanova et al., 2008) et chez les rats NEC (Vergnes et al., 2000). Akakin et collaborateurs (2011) ont rapporté que les GAERS possèdent un niveau basal plus élevé de GABA dans les fibres moussues dans CA3 que les NEC. La même étude a révélé, après l'embrassement de l'amygdale, qu'une augmentation du niveau de GABA chez les NEC, était un possible mécanisme de compensation. Le GABA est resté inchangé chez les GAERS (Akakin et al., 2011).

Les données obtenues dans notre étude montrent une augmentation de l'activité du noyau MD du thalamus, qui possède un rôle dans la modulation tant des crises limbiques que des crises d'absences. Cette activation peut aussi constituer un point clé supplémentaire dans l'interaction des deux formes d'épilepsie.



# Conclusion

## 6. CONCLUSION

L'augmentation du marquage de c-Fos dans les noyaux MD et LD du thalamus dans le groupe CRS montre une activation plus importante de ces noyaux indiquant leur possible participation dans l'effet modificateur de l'épileptogenèse liée au carisbamate ;

L'augmentation de la concentration de 5-HT dans l'hippocampe et dans le cortex piriforme pourrait refléter un mécanisme par lequel le carisbamate peut moduler les crises et exercer ainsi un effet neuroprotecteur ;

La réduction d'expression des protéines liées à la glycolyse et à la synthèse d'ATP, ainsi que l'augmentation des protéines liées au catabolisme du pyruvate pourrait être dû à un mécanisme compensatoire induit par le carisbamate et lié à une réduction de la voie glycolytique ;

L'augmentation d'expression des protéines Hspa8 et Dypsl2 observée dans le groupe DZP et sa normalisation chez les animaux traités par le carisbamate, ainsi que la réduction des protéines Adam17 et Tubb2c, peuvent avoir un impact sur des processus tels que la prolifération, la différenciation et la survie neuronales, empêchant ainsi l'exacerbation des altérations causées par l'état de mal.

## Perspectives

## **7. PERSPECTIVES**

Compte-tenu du fait que l'objectif de cette thèse a été de faire la lumière sur les altérations qui surviennent suite au traitement par le carisbamate, des études plus approfondies sont nécessaires pour vérifier à quel point ces altérations peuvent avoir un impact dans le cadre épiléptogène. Ainsi, différentes stratégies et hypothèses peuvent être soulevées à cette fin. Une étude sur des stimulations cérébrales profondes pourrait être réalisée pour vérifier si, en effectuant des stimulations dans le noyau MD ou LD durant la période aiguë suivies de stimulations quotidiennes durant 7 jours, celles-ci altèrent le devenir épiléptique. Une autre étude, utilisant un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, avec le même protocole d'administration du carisbamate, peut être conduite dans la tentative de reproduire les effets obtenus avec le carisbamate.

## **Références Bibliographiques**

## 6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Aggleton, J.P., Desimone, R., et Mishkin, M. (1986). The origin, course, and termination of the hippocampothalamic projections in the macaque. *J. Comp. Neurol.* *243*, 409–421.
- Aggleton, J.P., Saunders, R.C., Wright, N.F., et Vann, S.D. (2014). The origin of projections from the posterior cingulate and retrosplenial cortices to the anterior, medial dorsal and laterodorsal thalamic nuclei of macaque monkeys. *Eur. J. Neurosci.* *39*, 107–123.
- Ahn, S.-G., Kim, S.-A., Yoon, J.-H., et Vacratsis, P. (2005). Heat-shock cognate 70 is required for the activation of heat-shock factor 1 in mammalian cells. *Biochem. J.* *392*, 145–152.
- Akakin, D., Sirvanci, S., Gurbanova, A., Aker, R., Onat, F., et San, T. (2011). Ultrastructural GABA immunocytochemistry in the mossy fiber terminals of Wistar and genetic absence epileptic rats receiving amygdaloid kindling stimulations. *Brain Res.* *1377*, 101–108.
- Akman, O., Karson, A., Aker, R.G., Ates, N., et Onat, F.Y. (2010). Perirhinal cortical kindling in rats with genetic absence epilepsy. *Neurosci. Lett.* *479*, 74–78.
- Alzate, O. (2010). Neuroproteomics. In *Neuroproteomics*, O. Alzate, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press),.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., et O’Keefe, J. (2006). *The Hippocampus Book* (Oxford University Press).
- André, V., Ferrandon, A., Marescaux, C., et Nehlig, A. (2001). Vigabatrin protects against hippocampal damage but is not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* *47*, 99–117.
- André, V., Rigoulot, M.-A., Koning, E., Ferrandon, A., et Nehlig, A. (2003). Long-term pregabalin treatment protects basal cortices and delays the occurrence of spontaneous seizures in the lithium-pilocarpine model in the rat. *Epilepsia* *44*, 893–903.
- Andreyeva, A., Leshchyns’ka, I., Knepper, M., Betzel, C., Redecke, L., Sytnyk, V., et Schachner, M. (2010). CHL1 is a selective organizer of the presynaptic machinery chaperoning the SNARE complex. *PloS One* *5*, e12018.
- Arjunan, P., Nemeria, N., Brunskill, A., Chandrasekhar, K., Sax, M., Yan, Jordan, F., Guest, J.R., et Furey, W. (2002). Structure of the Pyruvate Dehydrogenase Multienzyme Complex E1 Component from *Escherichia coli* at 1.85 Å Resolution. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 5213–5221.
- Arruda, F., Cendes, F., Andermann, F., Dubeau, F., Villemure, J.G., Jones-Gotman, M., Poulin, N., Arnold, D.L., et Olivier, A. (1996). Mesial atrophy and outcome after amygdalohippocampectomy or temporal lobe removal. *Ann. Neurol.* *40*, 446–450.
- Aston-Jones, G., Rajkowski, J., Kubiak, P., Valentino, R.J., et Shipley, M.T. (1996). Role of the locus coeruleus in emotional activation. *Prog. Brain Res.* *107*, 379–402.

- Babb, T.L., Lieb, J.P., Brown, W.J., Pretorius, J., et Crandall, P.H. (1984). Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia* 25, 721–728.
- Babb, T.L., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Crandall, P.H., et Levesque, M.F. (1991). Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 42, 351–363.
- Banerjee, P.K., et Snead, O.C., 3rd (1994). Thalamic mediodorsal and intralaminar nuclear lesions disrupt the generation of experimentally induced generalized absence-like seizures in rats. *Epilepsy Res.* 17, 193–205.
- Banerjee, P.N., Filippi, D., et Allen Hauser, W. (2009). The descriptive epidemiology of epilepsy—A review. *Epilepsy Res.* 85, 31–45.
- Bay, H.H., et Cavdar, S. (2013). Regional connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat. *J. Integr. Neurosci.* 12, 201–219.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., Van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., 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.
- Bertram, E.H., Zhang, D.X., Mangan, P., Fountain, N., et Rempe, D. (1998). Functional anatomy of limbic epilepsy: a proposal for central synchronization of a diffusely hyperexcitable network. *Epilepsy Res.* 32, 194–205.
- Bertram, E.H., Mangan, P.S., Zhang, D., Scott, C.A., et Williamson, J.M. (2001). The Midline Thalamus: Alterations and a Potential Role in Limbic Epilepsy. *Epilepsia* 42, 967–978.
- Bertram, E.H., Zhang, D., et Williamson, J.M. (2008). Multiple roles of midline dorsal thalamic nuclei in induction and spread of limbic seizures. *Epilepsia* 49, 256–268.
- Bialer, M., Johannessen, S.I., Levy, R.H., Perucca, E., Tomson, T., et White, H.S. (2009). Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Ninth Eilat Conference (EILAT IX). *Epilepsy Res.* 83, 1–43.
- Bialer, M., Johannessen, S.I., Levy, R.H., Perucca, E., Tomson, T., et White, H.S. (2010). Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Tenth Eilat Conference (EILAT X). *Epilepsy Res.* 92, 89–124.
- Bien, C.G., Kurthen, M., Baron, K., Lux, S., Helmstaedter, C., Schramm, J., et Elger, C.E. (2001). Long-term seizure outcome and antiepileptic drug treatment in surgically treated temporal lobe epilepsy patients: a controlled study. *Epilepsia* 42, 1416–1421.
- Blumcke, I., Cross, J.H., et Spreafico, R. (2013). The international consensus classification for hippocampal sclerosis: an important step towards accurate prognosis. *Lancet Neurol.* 12, 844–846.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Canto, C.B., Wouterlood, F.G., et Witter, M.P. (2008). What Does the Anatomical Organization of the Entorhinal Cortex Tell Us? *Neural Plast.* *2008*.
- Cassel, J.-C., Pereira de Vasconcelos, A., Loureiro, M., Cholvin, T., Dalrymple-Alford, J.C., et Vertes, R.P. (2013). The reuniens and rhomboid nuclei: neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Prog. Neurobiol.* *111*, 34–52.
- Cassidy, R.M., et Gale, K. (1998). Mediodorsal thalamus plays a critical role in the development of limbic motor seizures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 9002–9009.
- Cavalheiro, E.A. (1995). The pilocarpine model of epilepsy. *Ital. J. Neurol. Sci.* *16*, 33–37.
- Cavalheiro, E.A., Elisabetsky, E., et Campos, C.J. (1981). Effect of brain serotonin level on induced hippocampal paroxysmal activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *15*, 363–366.
- Cavalheiro, E.A., Fernandes, M.J., Turski, L., et Naffah-Mazzacoratti, M.G. (1994). Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. *Epilepsia* *35*, 1–11.
- Chien, S., Bialer, M., Solanki, B., Verhaeghe, T., Doose, D.R., Novak, G., et Yao, C. (2006). Pharmacokinetic interaction study between the new antiepileptic and CNS drug RWJ-333369 and carbamazepine in healthy adults. *Epilepsia* *47*, 1830–1840.
- Chien, S., Yao, C., Mertens, A., Verhaeghe, T., Solanki, B., Doose, D.R., Novak, G., et Bialer, M. (2007). An interaction study between the new antiepileptic and CNS drug carisbamate (RWJ-333369) and lamotrigine and valproic acid. *Epilepsia* *48*, 1328–1338.
- Connolly, N.M.C., et Prehn, J.H.M. (2014). The metabolic response to excitotoxicity – lessons from single-cell imaging. *J. Bioenerg. Biomembr.* *47*, 75–88.
- Cooper, B.G., Manka, T.F., et Y, J. (2001). Finding your way in the dark: The retrosplenial cortex contributes to spatial memory and navigation without visual cues. *Behav. Neurosci.* *115*, 1012–1028.
- Corcoran, M.E., Fibiger, H.C., McCaughan Jr., J.A., et Wada, J.A. (1974). Potentiation of amygdaloid kindling and Metrazol-induced seizures by 6-hydroxydopamine in rats. *Exp. Neurol.* *45*, 118–133.
- Courtiol, E., et Wilson, D.A. (2013). Thalamic olfaction: Characterizing odor processing in the mediodorsal thalamus of the rat. *J. Neurophysiol.*
- Cushion, T.D., Paciorkowski, A.R., Pilz, D.T., Mullins, J.G.L., Seltzer, L.E., Marion, R.W., Tuttle, E., Ghoneim, D., Christian, S.L., Chung, S.-K., et al. (2014). De Novo Mutations in the Beta-Tubulin Gene TUBB2A Cause Simplified Gyral Patterning and Infantile-Onset Epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* *94*, 634–641.



- Danober, L., Deransart, C., Depaulis, A., Vergnes, M., et Marescaux, C. (1998). Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog. Neurobiol.* *55*, 27–57.
- Deshpande, L.S., Nagarkatti, N., Ziobro, J.M., Sombati, S., et DeLorenzo, R.J. (2008a). Carisbamate prevents the development and expression of spontaneous recurrent epileptiform discharges and is neuroprotective in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* *49*, 1795–1802.
- Deshpande, L.S., Nagarkatti, N., Sombati, S., et DeLorenzo, R.J. (2008b). The novel antiepileptic drug carisbamate (RWJ 333369) is effective in inhibiting spontaneous recurrent seizure discharges and blocking sustained repetitive firing in cultured hippocampal neurons. *Epilepsy Res.* *79*, 158–165.
- Dolleman-Van der Weel, M.J., et Witter, M.P. (2000). Nucleus reuniens thalami innervates gamma aminobutyric acid positive cells in hippocampal field CA1 of the rat. *Neurosci. Lett.* *278*, 145–148.
- Doná, F., Ulrich, H., Persike, D.S., Conceição, I.M., Blini, J.P., Cavalheiro, E.A., et Fernandes, M.J.S. (2009). Alteration of purinergic P2X4 and P2X7 receptor expression in rats with temporal-lobe epilepsy induced by pilocarpine. *Epilepsy Res.* *83*, 157–167.
- Eid, T., Kovacs, I., Spencer, D.D., et de Lanerolle, N.C. (2002). Novel expression of AMPA-receptor subunit GluR1 on mossy cells and CA3 pyramidal neurons in the human epileptogenic hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* *15*, 517–527.
- Engel, J. (2001). A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* *42*, 796–803.
- Engel, J., Jr (1996). Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* *26*, 141–150.
- Engel Jr., J., Burchfiel, J., Ebersole, J., Gates, J., Gotman, J., Homan, R., Ives, J., King, D., Lieb, J., Sato, S., et al. (1993). Long-term monitoring for epilepsy. Report of an IFCN committee. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* *87*, 437–458.
- Eşkazan, E., Onat, F.Y., Aker, R., Oner, G., et Onat, F.Y. (2002). Resistance to propagation of amygdaloid kindling seizures in rats with genetic absence epilepsy. *Epilepsia* *43*, 1115–1119.
- Faught, E., Holmes, G.L., Rosenfeld, W.E., Novak, G., Neto, W., Greenspan, A., Schmitt, J., Yuen, E., Reines, S., et Haas, M. (2008). Randomized, controlled, dose-ranging trial of carisbamate for partial-onset seizures. *Neurology* *71*, 1586–1593.
- Faure, J.-B., Akimana, G., Carneiro, J.E.M., Cosquer, B., Ferrandon, A., Geiger, K., Koning, E., Penazzi, L., Cassel, J.-C., et Nehlig, A. (2013). A comprehensive behavioral evaluation in the lithium-pilocarpine model in rats: effects of carisbamate administration during status epilepticus. *Epilepsia* *54*, 1203–1213.
- Faure, J.-B., Marques-Carneiro, J.E., Akimana, G., Cosquer, B., Ferrandon, A., Herbeaux, K., Koning, E., Barbelivien, A., Nehlig, A., et Cassel, J.-C. (2014). Attention and executive functions in a rat model of chronic epilepsy. *Epilepsia*.

Fernandes, M.J. (1994). Alteracoes neuroquimicas geradas no hipocampo de ratos, durante a formacao de um foco epiléptico induzido pela administracao sistêmica de pilocarpina. 109f. Tese (Doutorado em ciências) - Escola Paulista de Medicina.

Fernandes, M.J., Naffah-Mazzacoratti, M.G., et Cavalheiro, E.A. (1996). Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase activity in the rat hippocampus: a study in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem. Int.* 28, 497–500.

Fernandes, M.J. da S., Amorim, R.P., Carneiro, J.E.M., Araújo, M.G.L., et Persike, D.S. (2013). Proteomics-Based Strategy to Identify Biomarkers and Pharmacological Targets in Temporal Lobe Epilepsy. In *Pharmacoresistance in Epilepsy*, L. Rocha, et E.A. Cavalheiro, eds. (Springer New York), pp. 115–126.

Fernie, A.R., Carrari, F., et Sweetlove, L.J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 254–261.

Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., et Engel, J., Jr (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46, 470–472.

Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., et al. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475–482.

François, J., Koning, E., Ferrandon, A., et Nehlig, A. (2006). The combination of topiramate and diazepam is partially neuroprotective in the hippocampus but not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 72, 147–163.

François, J., Boehler, A., et Nehlig, A. (2008). Effects of carisbamate (RWJ-333369) in two models of genetically determined generalized epilepsy, the GAERS and the audiogenic Wistar AS. *Epilepsia* 49, 393–399.

François, J., Germe, K., Ferrandon, A., Koning, E., et Nehlig, A. (2011). Carisbamate has powerful disease-modifying effects in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology* 61, 313–328.

Freitas, R.M., Jordán, J., et Feng, D. (2010). Lipoic acid effects on monoaminergic system after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci. Lett.* 477, 129–133.

French, J.A., Williamson, P.D., Thadani, V.M., Darcey, T.M., Mattson, R.H., Spencer, S.S., et Spencer, D.D. (1993). Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann. Neurol.* 34, 774–780.

Gellman, R.L., et Aghajanian, G.K. (1993). Pyramidal cells in piriform cortex receive a convergence of inputs from monoamine activated GABAergic interneurons. *Brain Res.* 600, 63–73.

Gellman, R.L., et Aghajanian, G.K. (1994). Serotonin<sub>2</sub> receptor-mediated excitation of interneurons in piriform cortex: Antagonism by atypical antipsychotic drugs. *Neuroscience* 58, 515–525.

- Giessel, A.J., et Datta, S.R. (2014). Olfactory maps, circuits and computations. *Curr. Opin. Neurobiol.* *24C*, 120–132.
- Grabenstatter, H.L., et Dudek, F.E. (2008). A new potential AED, carisbamate, substantially reduces spontaneous motor seizures in rats with kainate-induced epilepsy. *Epilepsia* *49*, 1787–1794.
- Gratacós, F.M., et Brewer, G. (2010). The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *1*, 457–473.
- Gundersen, H.J., Jensen, E.B., Kiêu, K., et Nielsen J (1999). The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. *J. Microsc.* *193*, 199–211.
- Gurbanova, A.A., Aker, R.G., Sirvanci, S., Demiralp, T., et Onat, F.Y. (2008). Intra-amygdaloid injection of kainic acid in rats with genetic absence epilepsy: the relationship of typical absence epilepsy and temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 7828–7836.
- Haberly, L.B., et Price, J.L. (1978). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. I. Systems originating in the piriform cortex and adjacent areas. *J. Comp. Neurol.* *178*, 711–740.
- Halford, J.J., Ben-Menachem, E., Kwan, P., Ness, S., Schmitt, J., Eerdekens, M., et Novak, G. (2011). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy, safety, and tolerability of adjunctive carisbamate treatment in patients with partial-onset seizures. *Epilepsia* *52*, 816–825.
- Hanaya, R., Koning, E., Ferrandon, A., et Nehlig, A. (2008). The role of the inherited genetic background on the consequences of lithium-pilocarpine status epilepticus: study in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg and Wistar audiogenic rats. *Neurobiol. Dis.* *31*, 451–458.
- He, S., Wang, Q., He, J., Pu, H., Yang, W., et Ji, J. (2006). Proteomic analysis and comparison of the biopsy and autopsy specimen of human brain temporal lobe. *Proteomics* *6*, 4987–4996.
- Herkenham, M. (1978). The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J. Comp. Neurol.* *177*, 589–610.
- Herrero, M.-T., Barcia, C., et Navarro, J. (2002). Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Child's Nerv. Syst.* *18*, 386–404.
- Hertz, L. (2013). The glutamate–glutamine (GABA) cycle: importance of late postnatal development and potential reciprocal interactions between biosynthesis and degradation. *Cell. Endocrinol.* *4*, 59.
- Heverin, M., Brennan, G.P., Koehler, C.J., Treumann, A., et Henshall, D.C. (2012). Proteomic analysis of 14-3-3 zeta binding proteins in the mouse hippocampus. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* *4*, 74–83.

- Houser, C.R., Miyashiro, J.E., Swartz, B.E., Walsh, G.O., Rich, J.R., et Delgado-Escueta, A.V. (1990). Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J. Neurosci.* *10*, 267–282.
- Jacobs, J., Kahana, M.J., Ekstrom, A.D., Mollison, M.V., et Fried, I. (2010). A sense of direction in human entorhinal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 6487–6492.
- Janszky, J., Pannek, H.W., Janszky, I., Schulz, R., Behne, F., Hoppe, M., et Ebner, A. (2005). Failed surgery for temporal lobe epilepsy: predictors of long-term seizure-free course. *Epilepsy Res.* *64*, 35–44.
- Jones, E.G. (1975). Some aspects of the organization of the thalamic reticular complex. *J. Comp. Neurol.* *162*, 285–308.
- Kasper, B.S., Stefan, H., Buchfelder, M., et Paulus, W. (1999). Temporal lobe microdysgenesis in epilepsy versus control brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *58*, 22–28.
- Kato, K., Urino, T., Hori, T., Tsuda, H., Yoshida, K., Hashizume, K., et Tanaka, T. (2008). Experimental petit mal-like seizure induced by microinjection of kainic acid into the unilateral mediodorsal nucleus of the thalamus. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* *48*, 285–290; discussion 290–291.
- Kenchappa, R.S., Tep, C., Korade, Z., Urra, S., Bronfman, F.C., Yoon, S.O., et Carter, B.D. (2010). p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme/ADAM17. *J. Biol. Chem.* *285*, 20358–20368.
- Kwan, P., et Brodie, M.J. (2000). Early Identification of Refractory Epilepsy. *N. Engl. J. Med.* *342*, 314–319.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lee, C.-Y., Lee, M.-L., Shih, C.-C., et Liou, H.-H. (2011). Carisbamate (RWJ-333369) inhibits glutamate transmission in the granule cell of the dentate gyrus. *Neuropharmacology* *61*, 1239–1247.
- Von Lehe, M., Lutz, M., Kral, T., Schramm, J., Elger, C.E., et Clusmann, H. (2006). Correlation of health-related quality of life after surgery for mesial temporal lobe epilepsy with two seizure outcome scales. *Epilepsy Behav.* *EB 9*, 73–82.
- Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., et Cavalheiro, E.A. (1990). Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *14*, 511–517.
- Leshchyns'ka, I., Sytnyk, V., Richter, M., Andreyeva, A., Puchkov, D., et Schachner, M. (2006). The Adhesion Molecule CHL1 Regulates Uncoating of Clathrin-Coated Synaptic Vesicles. *Neuron* *52*, 1011–1025.

- Levy, R., Ragueneau-Majlessi, I., Solanki, B., Zannikos, P., Yao, C., et Novak, G. (2008). Pharmacokinetics, safety, and tolerability of the new antiepileptic carisbamate in the elderly. *Epilepsy Res.* *79*, 22–30.
- Litt, B., Esteller, R., Echaz, J., D'Alessandro, M., Shor, R., Henry, T., Pennell, P., Epstein, C., Bakay, R., Dichter, M., et al. (2001). Epileptic Seizures May Begin Hours in Advance of Clinical Onset: A Report of Five Patients. *Neuron* *30*, 51–64.
- Liu, L.-B., Omata, W., Kojima, I., et Shibata, H. (2003). Insulin Recruits GLUT4 from Distinct Compartments via Distinct Traffic Pathways with Differential Microtubule Dependence in Rat Adipocytes. *J. Biol. Chem.* *278*, 30157–30169.
- Liu, X., Wen, F., Yang, J., Chen, L., et Wei, Y.-Q. (2010). A review of current applications of mass spectrometry for neuroproteomics in epilepsy. *Mass Spectrom. Rev.* *29*, 197–246.
- Liu, Y., Yohrling, G.J., Wang, Y., Hutchinson, T.L., Brenneman, D.E., Flores, C.M., et Zhao, B. (2009). Carisbamate, a novel neuromodulator, inhibits voltage-gated sodium channels and action potential firing of rat hippocampal neurons. *Epilepsy Res.* *83*, 66–72.
- Loesch, K., Deng, L., Cowan, J.W., Wang, X., He, K., Jiang, J., Black, R.A., et Frank, S.J. (2006). Janus kinase 2 influences growth hormone receptor metalloproteolysis. *Endocrinology* *147*, 2839–2849.
- De Lores Arnaiz, G.R., et Ordieres, M.G.L. (2014). Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* *10*, 85–102.
- Löscher, W., et Brandt, C. (2010). Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol. Rev.* *62*, 668–700.
- LÖSCHER, W., et EBERT, U. (1996). THE ROLE OF THE PIRIFORM CORTEX IN KINDLING. *Prog. Neurobiol.* *50*, 427–481.
- Loughlin, S.E., et Fallon, J.H. (1984). Substantia nigra and ventral tegmental area projections to cortex: Topography and collateralization. *Neuroscience* *11*, 425–435.
- Mailloux, R.J. (2015). Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biol.* *4*, 381–398.
- Mamidi, R.N.V.S., Mannens, G., Annaert, P., Hendrickx, J., Goris, I., Bockx, M., Janssen, C.G.M., Kao, M., Kelley, M.F., et Meuldermans, W. (2007). Metabolism and excretion of RWJ-333369 [1,2-ethanediol, 1-(2-chlorophenyl)-, 2-carbamate, (S)-] in mice, rats, rabbits, and dogs. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *35*, 566–575.
- Mannens, G.S.J., Hendrickx, J., Janssen, C.G.M., Chien, S., Van Hoof, B., Verhaeghe, T., Kao, M., Kelley, M.F., Goris, I., Bockx, M., et al. (2007). The absorption, metabolism, and excretion of the novel neuromodulator RWJ-333369 (1,2-ethanediol, [1-(2-chlorophenyl)-, 2-carbamate, (S)-] in humans. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *35*, 554–565.

- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., et Babb, T.L. (1995). Influence of the type of initial precipitating injury and at what age it occurs on course and outcome in patients with temporal lobe seizures. *J. Neurosurg.* 82, 220–227.
- McKeown, M.J., et McNamara, J.O. (2001). When Do Epileptic Seizures Really Begin? *Neuron* 30, 1–3.
- Meador, K.J., Brashear, H.R., Wiegand, F., Zannikos, P., et Novak, G. (2011). Cognitive effects of carisbamate in randomized, placebo-controlled, healthy-volunteer, multidose studies. *Epilepsy Behav.* EB 22, 324–330.
- Mériaux, C., Franck, J., Park, D.B., Quanico, J., Kim, Y.H., Chung, C.K., Park, Y.M., Steinbusch, H., Salzet, M., et Fournier, I. (2014). Human temporal lobe epilepsy analyses by tissue proteomics. *Hippocampus* 24, 628–642.
- Mitchell, A.S., et Chakraborty, S. (2013). What does the mediodorsal thalamus do? *Front. Syst. Neurosci.* 7.
- Mizumori, S.J., et Williams, J.D. (1993). Directionally selective mnemonic properties of neurons in the lateral dorsal nucleus of the thalamus of rats. *J. Neurosci.* 13, 4015–4028.
- Morimura, R., Nozawa, K., Tanaka, H., et Ohshima, T. (2013). Phosphorylation of Dpsyl2 (CRMP2) and Dpsyl3 (CRMP4) is required for positioning of caudal primary motor neurons in the zebrafish spinal cord. *Dev. Neurobiol.* 73, 911–920.
- Morrisett, R.A., Jope, R.S., et Snead, O.C., 3rd (1987). Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. *Exp. Neurol.* 97, 193–200.
- Moshé, S.L., Perucca, E., Ryvlin, P., et Tomson, T. (2015). Epilepsy: new advances. *The Lancet* 385, 884–898.
- Muller, C.P., et Jacobs, B. (2009). *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin* (Academic Press).
- Murthy, A., Shao, Y.W., Narala, S.R., Molyneux, S.D., Zúñiga-Pflücker, J.C., et Khokha, R. (2012). Notch activation by the metalloproteinase ADAM17 regulates myeloproliferation and atopic barrier immunity by suppressing epithelial cytokine synthesis. *Immunity* 36, 105–119.
- Novak, G.P., Kelley, M., Zannikos, P., et Klein, B. (2007). Carisbamate (RWJ-333369). *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 4, 106–109.
- Okajima, K., Korotchkina, L.G., Prasad, C., Rugar, T., Phillips, J.A., Ficicioglu, C., Hertecant, J., Patel, M.S., et Kerr, D.S. (2008). Mutations of the E1 $\beta$  subunit gene (PDHB) in four families with pyruvate dehydrogenase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 93, 371–380.
- Patel, S., Millan, M.H., et Meldrum, B.S. (1988). Decrease in excitatory transmission within the lateral habenula and the mediodorsal thalamus protects against limbic seizures in rats. *Exp. Neurol.* 101, 63–74.

- Paxinos, G., et Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Sixth Edition: Hard Cover Edition (Amsterdam; Boston: Academic Press).
- Pereira, F.K.S., Neves, M.J., Lima, M.P., Braga, A.A., Pesquero, J.L., Doretto, M.C., et Borges, E.L. (2008). Peripheral glucose metabolism is altered by epileptic seizures. *Metab. Brain Dis.* 23, 105–114.
- Perucca, E. (2005). An Introduction to Antiepileptic Drugs. *Epilepsia* 46, 31–37.
- Pinault, D. (2004). The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46, 1–31.
- Pires, L.F., Costa, L.M., de Almeida, A.A.C., Silva, O.A., Cerqueira, G.S., de Sousa, D.P., Pires, R.M.C., Satyal, P., et de Freitas, R.M. (2015). Neuropharmacological effects of carvacryl acetate on  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase, Na(+), K(+)-ATPase activities and amino acids levels in mice hippocampus after seizures. *Chem. Biol. Interact.* 226, 49–57.
- Pitkänen, A., et Lukasiuk, K. (2011). Molecular biomarkers of epileptogenesis. *Biomark. Med.* 5, 629–633.
- Racine, R., et Coscina, D.V. (1979). Effects of midbrain raphe lesions or systemic p-chlorophenylalanine on the development of kindled seizures in rats. *Brain Res. Bull.* 4, 1–7.
- Ralevic, V., et Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413–492.
- Ramón y Cajal S. (1893). *Estructura del asta de Ammon y fascia dentata*.
- Ray, J.P., et Price, J.L. (1992). The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain–prefrontal cortex topography. *J. Comp. Neurol.* 323, 167–197.
- R Development Core Team, 2013 R Development Core Team (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Reime Kinjo, E., Arida, R.M., Mara de Oliveira, D., et da Silva Fernandes, M.J. (2007). The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase activity is increased in the hippocampus after multiple status epilepticus induced by pilocarpine in developing rats. *Brain Res.* 1138, 203–207.
- Rigoulot, M.A., Koning, E., Ferrandon, A., et Nehlig, A. (2004). Neuroprotective properties of topiramate in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 787–795.
- Robertshaw, H.J., et Brennan, F.M. (2005). Release of tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) by TNFalpha cleaving enzyme (TACE) in response to septic stimuli in vitro. *Br. J. Anaesth.* 94, 222–228.
- Rogawski, M.A. (2006). Diverse mechanisms of antiepileptic drugs in the development pipeline. *Epilepsy Res.* 69, 273–294.

- Sah, P., Faber, E.S.L., Armentia, M.L.D., et Power, J. (2003). The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiol. Rev.* 83, 803–834.
- Sheldon, P.W., et Aghajanian, G.K. (1990). Serotonin (5-HT) induces IPSPs in pyramidal layer cells of rat piriform cortex: evidence for the involvement of a 5-HT<sub>2</sub>-activated interneuron. *Brain Res.* 506, 62–69.
- Sheldon, P.W., et Aghajanian, G.K. (1991). Excitatory responses to serotonin (5-HT) in neurons of the rat piriform cortex: evidence for mediation by 5-HT<sub>1C</sub> receptors in pyramidal cells and 5-HT<sub>2</sub> receptors in interneurons. *Synap. N. Y. N* 9, 208–218.
- Shim, S., El Mansari, M., et Blier, P. (2013). Modulation of the antidepressant-like effects of sustained administration of carisbamate and lamotrigine on monoaminergic systems: electrophysiological studies in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 347, 487–496.
- Shukla, G., et Prasad, A.N. (2012). Natural History of Temporal Lobe Epilepsy: Antecedents and Progression. *Epilepsy Res. Treat.* 2012.
- Sloan, D.M., et Bertram, E.H., 3rd (2009). Changes in midline thalamic recruiting responses in the prefrontal cortex of the rat during the development of chronic limbic seizures. *Epilepsia* 50, 556–565.
- Sloan, D.M., Zhang, D., et Bertram, E.H., 3rd (2011a). Excitatory amplification through divergent-convergent circuits: the role of the midline thalamus in limbic seizures. *Neurobiol. Dis.* 43, 435–445.
- Sloan, D.M., Zhang, D., et Bertram, E.H., 3rd (2011b). Increased GABAergic inhibition in the midline thalamus affects signaling and seizure spread in the hippocampus-prefrontal cortex pathway. *Epilepsia* 52, 523–530.
- Sloviter, R.S., et Bumanglag, A.V. (2013). Defining “epileptogenesis” and identifying “antiepileptogenic targets” in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology* 69, 3–15.
- Sommer, W. (1880). Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. *Arch. Für Psychiatr. Nervenkrankh.* 10, 631–675.
- Sperling, M.R., Greenspan, A., Cramer, J.A., Kwan, P., Kälviäinen, R., Halford, J.J., Schmitt, J., Yuen, E., Cook, T., Haas, M., et al. (2010). Carisbamate as adjunctive treatment of partial onset seizures in adults in two randomized, placebo-controlled trials. *Epilepsia* 51, 333–343.
- Sutherland, R.J., Dringenberg, H.C., et Hoising, J.M. (1993). Induction of long-term potentiation at perforant path dentate synapses does not affect place learning or memory. *Hippocampus* 3, 141–147.
- Suzuki, N., et Bekkers, J.M. (2011). Two Layers of Synaptic Processing by Principal Neurons in Piriform Cortex. *J. Neurosci.* 31, 2156–2166.
- Taube, J.S. (2007). The Head Direction Signal: Origins and Sensory-Motor Integration. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 181–207.



- Thompson, C.D., Kinter, M.T., et Macdonald, T.L. (1996). Synthesis and in vitro reactivity of 3-carbamoyl-2-phenylpropionaldehyde and 2-phenylpropenal: putative reactive metabolites of felbamate. *Chem. Res. Toxicol.* *9*, 1225–1229.
- Trenité, D.G.A.K.-N., French, J.A., Hirsch, E., Macher, J.-P., Meyer, B.-U., Grosse, P.A., Abou-Khalil, B.W., Rosenfeld, W.E., van Gerven, J., Novak, G.P., et al. (2007). Evaluation of carisbamate, a novel antiepileptic drug, in photosensitive patients: an exploratory, placebo-controlled study. *Epilepsy Res.* *74*, 193–200.
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., and Turski, L. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.* *9*, 315–335.
- Valenstein, E., Bowers, D., Verfaellie, M., Heilman, K.M., Day, A., et Watson, R.T. (1987). Retrosplenial amnesia. *Brain J. Neurol.* *110* ( Pt 6), 1631–1646.
- Vann, S.D., Aggleton, J.P., et Maguire, E.A. (2009). What does the retrosplenial cortex do? *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 792–802.
- Vergnes, M., Boehrer, A., Reibel, S., Simler, S., et Marescaux, C. (2000). Selective Susceptibility to Inhibitors of GABA Synthesis and Antagonists of GABAA Receptor in Rats with Genetic Absence Epilepsy. *Exp. Neurol.* *161*, 714–723.
- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Do Valle, A.C., Sherman, A., et Rodriguez, J. j. (2006). Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* *499*, 768–796.
- Vianna, E.P.M., Ferreira, A.T., Naffah-Mazzacoratti, M.G., Sanabria, E.R.G., Funke, M., Cavalheiro, E.A., et Fernandes, M.J.S. (2002). Evidence that ATP participates in the pathophysiology of pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy: fluorimetric, immunohistochemical, and Western blot studies. *Epilepsia* *43 Suppl 5*, 227–229.
- Wagner, R.M., Cook, B.J., et Cooper, J.F. (1991). Action of taurine, 3-aminopropanesulfonic acid, and GABA on the hindgut and heart of the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* *16*, 81–93.
- Wei, Z., Yu, D., Bi, Y., et Cao, Y. (2015). A disintegrin and metalloprotease 17 promotes microglial cell survival via epidermal growth factor receptor signalling following spinal cord injury. *Mol. Med. Rep.*
- Van der Werf, Y.D., Witter, M.P., et Groenewegen, H.J. (2002). The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *39*, 107–140.
- Wiebe, S., Blume, W.T., Girvin, J.P. and Eliasziw, M. Effectiveness and Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study Group (2001). A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N. Engl. J. Med.* *345*, 311–318.
- WHO. Epilepsy - World Health Organization, 2012. Disponible sur: <[www.who.int/topics/epilepsy/en/](http://www.who.int/topics/epilepsy/en/)>. Accédé en: 2014.

Wieser, H.-G., et Häne, A. (2003). Antiepileptic drug treatment before and after selective amygdalohippocampectomy. *Epilepsy Res.* 55, 211–223.

Witter, M.P., et Groenewegen, H.J. (1990). The subiculum: cytoarchitectonically a simple structure, but hodologically complex. *Prog. Brain Res.* 83, 47–58.

Wittner, L., Eross, L., Szabó, Z., Tóth, S., Czirják, S., Halász, P., Freund, T.F., et Maglóczy, Z.S. (2002). Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 115, 961–978.

Wu, L., Peng, J., Wei, C., Liu, G., Wang, G., Li, K., et Yin, F. (2011). Characterization, using comparative proteomics, of differentially expressed proteins in the hippocampus of the mesial temporal lobe of epileptic rats following treatment with valproate. *Amino Acids* 40, 221–238.

Yao, C., Doose, D.R., Novak, G., et Bialer, M. (2006). Pharmacokinetics of the new antiepileptic and CNS drug RWJ-333369 following single and multiple dosing to humans. *Epilepsia* 47, 1822–1829.

## **Annexes**

## 7. ANNEXES

Annexe 1 – Avis du comité d'éthique de la recherche, Université fédérale de São Paulo.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 20 de janeiro de 2012

CEP Nº: 2072/11

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): José Eduardo Marques Carneiro da Silva

Disciplina/Departamento: Neurologia Experimental

Pesquisadores associados: Astrid Nehlig, Maria José da Silva Fernandes (orientadora), Jean-Christophe Cassel

### Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

**TÍTULO DO ESTUDO:** Aplicação do carisbamato como agente neuroprotetor e modificador da epileptogênese no modelo do lítio-pilocarpina: avaliação da expressão proteica e das alterações neuroquímicas cerebrais :

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Experimental, categoria C - estudo crônico

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Não se aplica

**OBJETIVO DO ESTUDO:** Os objetivos do projeto são empregar ratos submetidos ao modelo de epilepsia induzida por lítio-pilocarpina, pré-tratados ou não com carisbamato, para estudar os seguintes parâmetros: 1) A expressão de c-Fos para mapear as áreas ativadas diferencialmente durante o SE em ratos nas diferentes condições experimentais; 2) A expressão diferencial de proteínas no córtex piriforme e no hipocampo na fase crônica do modelo em ratos submetidos ou não ao carisbamato; 3) As concentrações de monoaminas (noradrenalina, dopamina e serotonina e seus metabólitos MHPG, DOPAC e 5-HIAA, respectivamente), e de aminoácidos (aspartato, glutamato, glicina, glutamina, serina, histidina, taurina e GABA) nas mesmas regiões e condições experimentais descritas em 2; 4) A memória recente e antiga pela aplicação de teste comportamental do labirinto aquático de Morris em ratos crônicos apresentando crises focais límbicas ou crises de ausência após tratamento com carisbamato.

**RESUMO:** Estudo com 80 ratos Sprague Dawley, machos, com 2 meses. Anestésico: tiopental. Analgésico: diazepam. Eutanásia: decapitação com procedimento anestésico. Todos os animais receberão cloreto de lítio (3 mg / kg, ip) e cerca de 20 horas mais tarde, o brometo de metilscopolamina (ME, 1 mg / kg, sc), para limitar os efeitos periféricos da pilocarpina que será administrada por via sub-cutânea na dose de 25 mg/kg, 30 minutos após a ME. Dois protocolos de tratamento com carisbamato será aplicado de acordo com a destinação dos grupos. Animais destinados ao estudo imuno-histoquímico e neuroquímico (dosagens de neurotransmissores por HPLC) serão estudados no período agudo do modelo. Assim, receberão apenas uma dose de carisbamato (90 mg/kg, i.p.) 1 hora após início do SE e serão eutanasiados 1 hora após injeção para os referidos protocolos. Animais crônicos destinados aos testes comportamentais e estudo de proteômica, receberão repetidas doses de carisbamato (90 mg/kg, i.p.), sendo a primeira dose injetada 1 hora após o início do SE, a segunda 8 horas mais tarde, seguida de duas aplicações diárias, por via sub-cutânea, por 6 dias adicionais. Os animais experimentais serão videomonitorados para a identificação da presença de crises espontâneas. A gravação por vídeo será iniciada 2 semanas após início do SE e será feita 10 horas por dia durante dois meses. Serão constituídos os seguintes grupos: Pilo/CRB-CPC: animais submetidos ao SE por lítio-pilocarpina, tratados com carisbamato e que desenvolvam crises focais límbicas espontâneas e recorrentes; Pilo/CRB-DPO: idem ao grupo acima, porém que desenvolvam crises de ausência (descargas ponta-onda, DPO); Pilo: animais submetidos ao SE por lítio-pilocarpina que desenvolvam crises focais espontâneas e recorrentes; CT1: grupo controle composto de animais tratados com salina e carisbamato; CT2: grupo controle composto de animais tratados somente com solução salina. Será realizado um estudo imuno-histoquímico para c-Fos. Após serem submetidos aos testes comportamentais, os animais serão utilizados para o estudo da expressão de proteínas pelo método de proteômica nas áreas de interesse (hipocampo e córtex piriforme). Iserá realizada análise de aminoácidos e monoaminas por HPLC no córtex piriforme e hipocampo de ratos sacrificados 2 meses após indução do SE.

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais freqüente dentre as epilepsias e aproximadamente 30% dos pacientes apresentam crises farmacorresistentes. A epilepsia sintomática é considerada uma doença progressiva geralmente com início a partir de uma agressão ao sistema nervoso, incluindo traumas, hipóxia e isquemia, crises febris na infância, tumores etc, capaz de produzir alterações epileptogênicas permanentes no encéfalo. O período de latência que ocorre entre o evento inicial e o aparecimento das crises espontâneas é considerado crítico por ser um momento em que a circuitaria anômala é gerada. A descrição de eventos morfológicos e bioquímicos que ocorrem durante as diferentes fases do processo epileptogênico pode trazer importante contribuição na busca de novas estratégias terapêuticas. Nesse sentido, os modelos experimentais de epilepsias farmacorresistentes oferecem vantagens, pois permitem estudar diferentes eventos nas diferentes fases da epileptogênese em curto espaço de tempo. O modelo de epilepsia induzida por pilocarpina, associado ou não o lítio, tem sido bastante utilizado com esta finalidade. O carisbamato, uma nova droga antiepiléptica em fase experimental, quando aplicada ao modelo de epilepsia lesional induzida por lítio-pilocarpina, além de promover neuroproteção, também é capaz de inibir ou modificar o padrão de crises apresentadas pelos ratos, transformando as crises focais límbicas em crises de ausência. Por esta razão, o carisbamato tem sido considerado uma molécula promissora para o tratamento da epilepsia por ser a primeira molécula com ação antiepiléptica já descrita. Os mecanismos pelos quais o carisbamato exerce tais efeitos ainda são pouco conhecidos.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos do estudo

**TCLE:** Não se aplica

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** CAPES - R\$ 30100,00

**CRONOGRAMA DO ESTUDO:** 36 meses

**PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA :** 14/01/2013 e 09/01/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

## Annexe 2 – Liste de production scientifique

### CHAPITRE DE LIVRE

Maria José da Silva Fernandes, Rebeca Padrão Amorim, **José Eduardo Marques Carneiro**, Michelle Gasparetti Leão Araújo, Daniele Suzete Persike (2013). "Proteomics-Based Strategy to Identify Biomarkers and Pharmacological Targets in Temporal Lobe Epilepsy". In: *Pharmacoresistance in Epilepsy: From Genes and Molecules to Promising Therapies* (Luisa Rocha, Esper A. Cavalheiro). Springer, pp 115-126. (DOI 10.1007/978-1-4614-6464-8\_8)

### ARTICLE DE REVUE

Maria Jose da Silva Fernandes, **José Eduardo Marques-Carneiro**, Rebeca Padrão Amorim, Michelle Gasparetti Leao Araujo, Astrid Nehlig. (2015). "Neuroprotective agents and modulation of temporal lobe epilepsy". *Front Biosci, Elite, 7, 1 – 1* (DOI:10.2741/E719).

### ARTICLES PUBLIES

**José Eduardo Marques-Carneiro**, Jean-Baptiste Faure, Brigitte Cosquer, Estelle Koning, Arielle Ferrandon, Anne Pereira de Vasconcelos, Jean-Christophe Cassel, et Astrid Nehlig. (2014). "Anxiety and locomotion in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS): Inclusion of Wistar rats as a second control". *Epilepsia* 55 :1460-8. (DOI: 10.1111/epi.12738) .

Faure JB, Akimana G, **Carneiro JE**, Cosquer B, Ferrandon A, Geiger K, Koning E, Penazzi L, Cassel JC, Nehlig A. (2013). "A comprehensive behavioral evaluation in the lithium-pilocarpine model in rats: Effects of carisbamate administration during status epilepticus". *Epilepsia* 54.1203-13. (DOI: 10.1111/epi.12219)

Faure JB, **Marques-Carneiro JE**, Akimana G, Cosquer B, Ferrandon A, Herbeaux K, Koning E, Barbelivien A, Nehlig A et Cassel JC. (2014). "Attention and executive functions in a rat model of chronic epilepsy". *Epilepsia* 55 :644-53. (DOI: 10.1111/epi. 12549)

### ARTICLE SOUMIS

**José Eduardo Marques-Carneiro**, Jean-Baptiste Faure, Alexandra Barbelivien, Astrid Nehlig, et Jean-Christophe Cassel. (2014). "Alterations in memory systems but normal visual attention in the GAERS model of absence epilepsy". *Epilepsia* (soumis).

### ARTICLES EM PREPARATION

**José Eduardo Marques-Carneiro**, Eduardo Ferreira de Castro-Neto, Luis Sierra, Julia Julie Litzahn, Jean-Christophe Cassel, Maria da Graça Naffah Mazzacoratti, Astrid Nehlig, Maria José da Silva Fernandes. "Acute alterations following carisbamate administration after SE induced by pilocarpina: a map brain activity and neurochemical changes". (em preparation)

**José Eduardo Marques-Carneiro**, Daniele Suzete Persike, Rebeca Padrão Amorim, Julia Julie Litzahn, Jean-Christophe Cassel, Astrid Nehlig, Maria José da Silva Fernandes. "Proteomic profile of chronic epileptic rats treated with carisbamate over seven days after SE". (en preparation)

**José Eduardo MARQUES CARNEIRO DA SILVA**

**Application du carisbamate comme agent neuroprotecteur et modificateur de l'épileptogénèse dans le modèle Lithium-Pilocarpine : évaluation de l'expression protéique et des altérations neurochimiques cérébrales**

Le carisbamate est la 1<sup>ère</sup> molécule à avoir un effet modificateur de l'épileptogénèse, dont environ 50% des animaux traités développent des crises d'absence, au lieu des crises limbiques normalement observées dans le modèle de la pilocarpine. Le principal objectif de cette thèse a été celui d'étudier les altérations qui se produisent par le traitement par le carisbamate. Pour cela nous avons effectué une cartographie de l'activité cérébrale, avec un immunomarquage de la protéine c-Fos, et nous avons vérifié les concentrations des monoamines et acides aminés dans l'hippocampe, le thalamus et dans le cortex piriforme par HPLC, 4h après le début du status epilepticus (SE). Enfin, nous avons vérifié le profil d'expression protéique dans l'hippocampe, 2 mois après le SE par électrophorèse bidimensionnelle.

Les résultats indiquent que le carisbamate augmente l'activité des noyaux MD et LD du thalamus. Les résultats suggèrent aussi que la dopamine, la noradrenaline, le GABA et la sérotonine peuvent participer à la significative neuroprotection et à l'effet modificateur de l'épileptogénèse du carisbamate. L'étude de protéomique suggère également une réduction globale du métabolisme énergétique cellulaire chez les rats traité par le carisbamate qui développent des crises d'absence.

**Mots-clés :** Epilepsie du lobe temporal, Protéomique, Acides aminés, Monoamines, Pilocarpine.

The carisbamate is the 1<sup>st</sup> molecule showing an epileptogenesis modifying effect, that about 50% of treated animals develops absence instead limbic seizures, commonly seen in the pilocarpine model. The aim of this thesis was to study the changes that follows carisbamate treatment. Therefore, we made a brain activity cartography, by labelling c-Fos protein, and we quantified the concentrations of amino acids and monoamines in hippocampus, thalamus and piriform cortex, 4h after the status epilepticus (SE). Moreover, we studied the protein expression profile in the hippocampus, 2 month after SE, by two-dimensional electrophoresis.

The results points towards an increased activity of MD and LD thalamic nuclei in carisbamate treated rats. Furthermore, dopamine, noradrenaline, GABA and serotonin appears to play a role in neuroprotection and in the epileptogenesis modifying effect of carisbamate. The proteomic study revealed a global reduction of cellular energetic metabolism of carisbamate treated rats that develops absence seizures.

**Key-words:** Temporal lobe epilepsy, Proteomics, Amino acids, Monoamines, Pilocarpine.