



HAL
open science

Caractérisation de l'hyperexcitabilité cérébrale dans des modèles murins d'épilepsies génétiques et développement d'une nouvelle stratégie pour la réduire

Jennifer Lavigne

► **To cite this version:**

Jennifer Lavigne. Caractérisation de l'hyperexcitabilité cérébrale dans des modèles murins d'épilepsies génétiques et développement d'une nouvelle stratégie pour la réduire. Sciences agricoles. Université Côte d'Azur, 2016. Français. NNT : 2016AZUR4053 . tel-01756389v2

HAL Id: tel-01756389

<https://theses.hal.science/tel-01756389v2>

Submitted on 12 Jun 2018

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.

Thèse

pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences de la Vie
de l'Université Côte d'Azur

Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

Soutenue et présentée par

Jennifer LAVIGNE

Caractérisation de l'hyperexcitabilité cérébrale dans des modèles murins d'épilepsies génétiques et développement d'une nouvelle stratégie pour la réduire

Thèse dirigée par le Dr. Massimo MANTEGAZZA

Soutenue le 09 septembre 2016

Devant le Jury composé de :

Professeur Jacques NOEL

Docteur Philippe LORY

Docteur Benoit MARTIN

Docteur Massimo MANTEGAZZA

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Résumé de thèse

Etude de l'hyperexcitabilité cérébrale dans des modèles murins d'épilepsies génétiques et développement d'une nouvelle stratégie pour la réduire.

L'épilepsie est l'affection neurologique la plus fréquente après la migraine. Les symptômes se caractérisent par la récurrence de crises épileptiques dues à une hyperexcitabilité cérébrale, correspondant à des décharges neuronales hyper-synchronisées et excessives.

Les canaux sodiques dépendants du potentiel (Na_v) sont des acteurs essentiels de l'excitabilité neuronale, puisqu'ils sont responsables de la génération et de la propagation des potentiels d'action d'un neurone à l'autre. De nombreuses mutations du gène *SCN1A*, codant pour la sous-unité α du canal $\text{Na}_v1.1$, sont à l'origine des mécanismes pathologiques aboutissant à des épilepsies génétiques. Il a été montré que les canaux $\text{Na}_v1.1$ jouent un rôle majeur dans l'excitabilité des neurones inhibiteurs GABAergiques (Yu et al., 2006). La mutation des canaux $\text{Na}_v1.1$ provoque un dysfonctionnement de l'excitabilité de ces neurones, dont résulte une diminution de l'inhibition cérébrale. Ce phénomène est à l'origine de l'hyperexcitabilité neuronale responsable de la génération des crises épileptiques (Ogiwara et al., 2007 ; Cheah et al., 2012).

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude de deux modèles murins d'épilepsies génétiques de l'enfance liées à des mutations des canaux $\text{Na}_v1.1$: le Syndrome de Dravet (SD), une épilepsie pharmaco-résistante sévère, et l'Epilepsie Génétique avec Convulsions Fébriles Plus (EGCF+), présentant un phénotype plus modéré.

Dans les modèles murins, comme pour les patients, il existe une période de latence avant la période épileptique durant laquelle la cause de l'épilepsie (protéine mutée) est présente, sans que les crises épileptiques ne soient encore manifestées. Dans des modèles d'épilepsies non génétiques cette période, appelée « épileptogenèse », correspond à des réarrangements neuronaux qui se mettent en place jusqu'à déclencher la génération des crises. La première partie de mes travaux de thèse concerne cette période. Ils ont permis de mettre en évidence des formes d'hyperexcitabilité dans des tranches de cerveau prélevés sur ces modèles murins avant l'apparition des premières crises, révélant une « épileptogenèse » dans ces modèles d'épilepsie génétique. En revanche, des enregistrements effectués *in vivo* sur le modèle du SD ne montrent pas de signe d'hyperexcitabilité dans les structures cérébrales, supposant la mise en place de mécanismes d'homéostasie lors de la période pré-épileptique.

Le SD est une épilepsie résistante à tous les traitements développés à ce jour. Il se caractérise par de violentes crises cloniques pouvant parfois entraîner la mort, mais également par le développement d'autres symptômes, tels que des ataxies, des troubles sociaux et cognitifs. La sévérité de ces symptômes montre une réelle urgence médicale. La seconde partie de mes travaux de thèse, concerne l'identification de conditions expérimentales optimales pour induire des activités épileptiformes spécifiques dans le but de les utiliser par la suite pour tester l'efficacité d'éventuels traitements. Pour réaliser cette étude nous avons utilisé des tranches de cerveau du modèle murin du SD. Nos résultats suggèrent que, bien que l'étude sur tranches de cerveaux fournisse des informations sur l'excitabilité du réseau neuronal, elle ne semble pas assez intégrée dans nos conditions expérimentales pour permettre de reproduire fidèlement l'effet de différents traitements observé *in vivo*.

La dernière partie de mes travaux de thèse visait à mettre au point une stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale. Pour ce faire nous avons utilisé une technique d'ARNs interférents délivrés à l'aide de vecteurs viraux, afin de diminuer l'expression de certaines cibles d'intérêt. L'effet de ces constructions virales a été étudié *in vivo* sur les crises observées dans le modèle murin du SD.

Abstract

Cerebral hyperexcitability study of genetic epilepsy murine models and development of new therapeutic strategy to reduce it.

Epilepsy is the most frequent neurological affection after migraine. Its symptoms are characterized by the recurrence of epileptic seizures due to cerebral hyperexcitability, corresponding to hyper-synchronized and excessive neuronal discharges.

The voltage-gated sodium channels (Na_v) are essential actors of the neuronal excitability, as they are responsible of the generation and the propagation of action potentials. Numerous mutations of the *SCN1A* gene, coding for the α subunit of the $\text{Na}_v1.1$ channel, are involved in pathological mechanisms of genetic epilepsies. This isoform of sodium channels is particularly important for the excitability of inhibitory neurons (Yu and al., 2006). Thus, mutations of $\text{Na}_v1.1$ channels cause a dysfunction of the excitability of GABAergic interneurons resulting in a decrease of the cerebral inhibition. This phenomenon is at the origin of the network hyperexcitability that is responsible for the generation of epileptic seizures (Ogiwara and al., 2007; Cheah and al., 2012).

During my thesis, I studied two murine models of childhood genetic epilepsies, caused by mutations of $\text{Na}_v1.1$ channels: Dravet Syndrome (DS), a severe and drug resistant epilepsy, and Genetic Epilepsy with Febrile Seizures Plus (GEFS+), characterized by a milder phenotype.

In the murine models, as for the patients, there is a latency period before the epileptic period, in which the cause of the epilepsy (mutated protein) is present but there are no epileptic seizures. In models of acquired (non-genetic) epilepsy, this period is called “epileptogenesis” and corresponds to the progressive rearrangements of the properties of neuronal networks that eventually lead to the generation of spontaneous seizures (period of chronic epilepsy). In the first part of my thesis, I focused my studies on this latency period and our work allowed to disclose forms of hyperexcitability in brain slices of these murine models before the onset of seizures, revealing that, also in these models of genetic epilepsies, there is an “epileptogenic period” in which the properties of the networks are progressively modified. However, *in vivo* recording in DS model did not show clear evidence of hyperexcitability in cerebral structures, consistently with the presence of homeostatic mechanisms during the pre-epileptic period.

DS is resistant to all treatments developed until now. It is characterized by severe clonic seizures which can sometimes provoke death, but it is also characterized by severe co-morbidities, such as ataxia and social/cognitive deficits. The severity of DS makes it a real medical emergency. The second part of my thesis has been focused on the identification of the best experimental conditions for inducing specific epileptiform activities in brain slices of the murine DS model, in order to use them for drug screening. However, our results suggest that although the brain slices model allow to obtain information on the excitability of neuronal networks, it does not seem integrated enough in our experimental conditions for reproducing faithfully the effect of various treatments observed *in vivo*.

The last part of my thesis consisted in developing a new strategy to reduce the hyperexcitability of the neuronal networks by using an RNA interference technique delivered by viral vectors, to decrease the expression of specific targets of interest. Thus, I studied the effect of this “treatment” *in vivo* on the seizures observed in DS murine model.

A la mémoire de mon arrière-grand-mère Suzanne Ranc...

*« Le meilleur moyen de réaliser l'impossible
c'est de croire que c'est possible »
(Alice au pays des merveilles ;
Lewis Carroll)*

Remerciements...

➤ *Je tiens tout d'abord à remercier et à témoigner mon plus grand respect à mon Directeur de Thèse le Dr. Massimo Mantegazza, qui m'a donné l'opportunité de faire partie intégrante de son laboratoire en me kidnappant et m'y enfermant ces quatre dernières années. Sa passion pour la recherche, son pragmatisme et sa patience m'ont poussé à m'investir dans mes travaux en donnant le meilleur de moi-même, même dans les moments difficiles.*

➤ *Je remercie le Dr. Jacques Noel d'avoir accepté d'être le président de mon Jury, ainsi que pour les conseils qu'il a su me prodiguer durant ma thèse. Merci au Dr. Philippe Lory et au Dr. Benoit Martin d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse.*

➤ *Merci à tous ceux avec qui j'ai eu le plaisir de travailler :*

Mes sincères remerciements aux souris, sans qui la recherche médicale et mes travaux de thèse n'auraient pas été possible.

Un grand remerciement à toute mon équipe si authentique avec qui nous avons partagé tant de choses, allant de la science, du rire aux larmes :

- *Merci à Sandrine « maman de labo », pour tous ses conseils précieux, sa compassion, ses attentions et sa tendresse qui furent d'une grande aide au cours de ces 4 années.*
- *Merci à ma petite Marionette, qui fût un pilier pour sa participation aux travaux effectués au cours de ma thèse. Merci pour son aide, ses cagades, pour tous ces fous rires et cette complicité qui ont permis la naissance d'une réelle amitié.*
- *Merci à Oana (une super nana), pour tous les conseils et le soutien qu'elle a su me donner à tous les niveaux aux moments où j'en avais le plus besoin.*
- *Merci à Fabrice, ce « grand homme » qui n'a jamais hésité à prendre de son temps pour faire partager son aide, son expérience et son expertise.*
- *Merci à Sarah pour sa bonne humeur quotidienne, pour les discussions passionnantes de culture générale et d'anecdotes (et pour les pokemons).*
- *Merci à Alexandre, le dernier venu, mais qui n'a pas trainé pour s'intégrer à l'équipe et au « KiKaDiKoi ».*
- *Merci à tous les étudiants qui ont été de passage (surtout s'ils ont fait des gâteaux).*
- *Merci à Super-Mag, notre gestionnaire bien-aimée qui sait tellement bien nous faciliter la vie administrative.*

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au sein de l'institut, plus particulièrement à Thomas Maurin et à Lenka Schorova dont l'aide m'a permis de finaliser cette thèse, et merci à l'étage IPMC2 RDC pour la bonne ambiance qui y règne. Merci à Melissa et Sandrine pour leur collaboration et leurs conseils.

Merci également aux équipes d'Italie avec qui nous avons collaboré, plus particulièrement Giulia Curia, Anna Fasio, Giulia Bechi, Paolo Scalmani, Benedetta Terragni et Chiara Lucchi.

➤ *Merci à tous mes amis qui sont toujours là même après la thèse : Juj, Ben, Benichou, Cha, Dod, Ninou, Zozo, Chaleur, Cess, Thomas, Del, Francis, Doudou, Lolotte, Marion, Bubulle, Lolo, Halima, Fanfan, Le Roux, Jérôme, Christelle, Didick, Sev, Chachou, Seb et tous ceux que j'oublie.*

➤ *Un grand merci à toute ma famille, qui m'a toujours soutenue dans tout ce que j'ai entrepris :*

- *Merci à mon père et à nos discussions si passionnantes (et parfois surprenantes). Il a su me transmettre sa passion pour les mystères de la science.*
- *Merci ma ptite mère, la meilleure des mamans, pour son soutien et son aide qu'elle m'apporte chaque jour et les rires qu'elle fait sans cesse entrer dans nos vies (parfois malgré elle).*
- *Merci à ma sœur (qui sera considérée comme « indigne » si elle n'est pas là le jour de ma soutenance) et à sa force de caractère qui m'a toujours poussé à ne pas baisser les bras et à aller de l'avant.*
- *Merci à tout le reste de ma famille dont je suis si fière de faire partie.*

Et merci à Julian, mon vaillant Toupoutou, pour me supporter sans jamais se plaindre dans les bons et les mauvais moments.

Table des matières

Abréviations	15
Introduction	19
Introduction générale	20
1. Epilepsie.....	20
• Histoire de l'épilepsie	20
• Définition de l'épilepsie	21
• Caractérisation des crises	21
• Causes de l'épilepsie.....	23
• Epilepsies génétiques	23
2. Communication neuronale.....	25
• Physiologie du neurone	25
• Canaux sodiques	29
1) Fonction	29
2) Structure	30
• Canaux sodiques Na _v 1.1.....	32
3. Pathologie humaine : Epilepsies liées aux mutations du canal Na _v 1.1	33
• Généralités.....	33
• Epilepsies Généralisées avec Convulsions Fébriles Plus (EGCF+)	35
• Syndrome de Dravet (SD)	36
• Diagnostique des épilepsies génétiques.....	37
4. Recherche fondamentale : Modèles animaux d'épilepsies liées aux mutations du canal Na _v 1.1 ..	39
• Modèles animaux	39
1) Modèle murin de l'Epilepsie Génétique avec Convulsions Fébriles Plus	40
2) Modèle murin du Syndrome de Dravet.....	42
Introduction du sujet de thèse	44
1. Etude de la période pré-épileptique	44
• Etude de la période pré-épileptique chez le modèle murin de l'EGCF+.....	44
• Etude de la période pré-épileptique chez le modèle murin du SD.....	46
2. Etude de l'épilepsie chronique sur le modèle de SD.....	48

3. Nouvelle stratégie visant à réduire l'excitabilité cérébrale.....	49
• Thérapie génique utilisant l'interférence par ARN.....	51
• Vecteur viraux.....	53
• Effet des constructions virales sur le modèle murin du SD.....	56

Matériel & Méthodes 57

Animaux utilisés.....	58
1. Modèle murin de l'Epilepsie Génétique avec Crises Fébriles Plus.....	58
• Génotypage.....	58
2. Modèle murin du Syndrome de Dravet.....	59
• Génotypage.....	60
• Etude de la période pré-épileptique et de l'épilepsie chronique.....	61
• Etude de l'effet de la nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité.....	61
Expériences <i>in vitro</i>	62
1. Electrophysiologie sur tranches de cerveaux.....	62
• Préparation et maintien des tranches de cerveau.....	62
1) Tranches Thalamo-Corticales (TC).....	62
2) Tranches Hippocampo-Corticales.....	63
3) Maintien des tranches avant et pendant l'expérience.....	63
• Enregistrement des tranches en potentiel de champ.....	64
1) Activités spontanées.....	64
2) Stimulations électriques.....	64
3) Perfusion d'agents pharmacologiques.....	65
2. Test des constructions visant à réduire l'excitabilité cérébrale <i>in vitro</i>	66
• Développement des mi/shARN.....	66
• Tests des vecteurs viraux contenant les séquences mi/shARN.....	68
Expériences <i>in vivo</i>	70
1. Enregistrements extracellulaire de l'hippocampe et du cortex en période pré-épileptique sur le modèle murin du SD.....	70
2. Effet de la stratégie visant à réduire l'excitabilité cérébrale <i>in vivo</i>	73
• Administration des constructions virales et implantation des électrodes.....	73
• Enregistrements vidéo-ECoG.....	75
• Induction de crises par hyperthermie.....	77

• Quantification de l'expression des gènes des canaux Na _v	78
Microscopie et (Immuno)histochimie.....	80
1. Perfusion intracardiaque de Paraformaldéhyde	80
2. Histochimie.....	81
3. Immunohistochimie.....	81
Tests statistiques.....	81
Partie I : Etude de la période pré-épileptique.....	82
EGCF+ : Période pré-épileptique.....	83
1. Propriétés intrinsèques des neurones du réseau TC et de l'hippocampe:	100
2. Etude des réseaux neuronaux du modèle murin de l'EGCF+	101
3. Conclusion des résultats de l'article.....	103
Syndrome de Dravet : Période pré-épileptique	104
1. Caractérisation de l'hyperexcitabilité sur tranches Hippocampo-Corticales	104
• Activité basale du réseau Hippocampo-Cortical.....	104
• Hyperexcitabilité induite de l'hippocampe en période pré-épileptique	108
2. Effet de la CCK sur l'hyperexcitabilité de l'hippocampe en période pré-épileptique	111
3. Etude du réseau Hippocampo-Cortical <i>in vivo</i>	113
Partie II : Etude de l'épilepsie chronique sur le modèle murin du SD	118
1. Perfusion des tranches Hippocampo-Corticales avec du « LCSa High-K+ »	120
2. Perfusion des tranches Hippocampo-Corticales avec du « LCSa Mg ²⁺ free »	121
3. Perfusion des tranches Hippocampo-Corticales avec de la 4-AP	123
4. Effet de la CBZ sur le modèle d'induction d'hyperexcitabilité « 4-AP ».....	125
Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD..	128
1. Validation de l'ARNi permettant de réduire les courants sodiques dans les neurones glutamatergiques.....	129
2. Validation du vecteur viral contenant la séquence d'intérêt.....	132
3. Evaluation de la stratégie <i>in vivo</i> sur le modèle murin du SD.....	137
• Test des vecteurs viraux à des titres de particules infectieuses et volumes élevés.....	137
• Ajustement du titre et du volume de vecteur viral	139
Discussion et Perspectives	145
1. Etude de la période pré-épileptique	146
• Période pré-épileptique du modèle murin de l'EGCF+.....	146

1) Propriétés intrinsèques des neurones.....	146
2) Etude des réseaux neuronaux	147
• Période pré-épileptique du modèle murin du SD.....	148
1) Etude du réseau Hippocampo-Cortical sur tranches en période pré-épileptique	149
2) Etude du réseau Hippocampo-Cortical en période pré-épileptique <i>in vivo</i>	149
2. Etude de l'épilepsie chronique sur le modèle murin du SD.	151
3. Développement d'une stratégie visant à réduire l'hyperexcitabilité du modèle murin du SD.....	153
• Développement et validation des constructions.....	153
• Effet des constructions <i>in vivo</i>	154
4. Conclusion	157
Bibliographie	159

Abréviations

4-AP : 4-Aminopyridine

AAV : *Adéno-Associated Virus* (Adénovirus associé)

ADNc : ADN complémentaire

Ank-G : Ankyrine G

AP : Antéro-Postérieur

ARNi : ARN interférent

ARNm : ARN messenger

β act : β -actine

Ca²⁺ : Calcium

CamKIIa : Protéine kinase Ca²⁺/Calmoduline dépendant

CBZ : Carbamazépine

CCK : Cholecystokinine

CCK+ : Interneurone exprimant la cholécystokinine

CE : Cortex Entorhinal

CMV : Cytomégalovirus

CPSI : Courants Post-Synaptiques Inhibiteurs

DDP : Différence De Potentiel

DPO : Décharges de type Pointes-Ondes

ECoG : ElectroCorticoGramme

EEG : ElectroEncéphaloGramme

EGCF+ : Epilepsie Généralisée avec Convulsions Fébriles Plus

EMSN : Epilepsie Myoclonique Sévère du Nourrisson

ER : Echelle de Racine

Gad2 : Glutamate décarboxylase

Gapdh : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

HEK : *Human Embryonic Kidney* (épithélium rénal embryonnaire)

IDEA league : International Dravet syndrome Epilepsy Action League

ITR : *Inverted terminal repeat* (séquence inversée répétée)

JIV : Jours *in vitro*

JPI : Jours post-infection

K⁺ : Potassium

KI : Knock-in

KO : Knock-out

Lat : Latéral

LCSa : Liquide Cérébrospinal artificiel

MAE : Médicament Antiépileptique

MEA : *Mutielelectrode Array* (réseau de multiélectrodes)

Mg²⁺ : Magnésium

miARN : micro-ARN

MSIE : Mort Subite et Inexpliquée en Epilepsie

Na_v : Canaux Sodiques dépendant au voltage

Na_v1.1^{-/-} : Mutation homozygote KO du gène Scn1a

Na_v1.1^{+/-} : Mutation hétérozygote KO du gène Scn1a

Na_v1.1^{RH/+} : Mutation hétérozygote R1648H du gène Scn1a

Na_v1.1^{RH/RH} : Mutation homozygote R1648H du gène Scn1a

OHF : Oscillations à haute fréquence

PA : Potentiel d'Action

PBS : *Phosphate-buffered saline* (Tampon phosphate salin)

PCR : *Polymerase Chained Reaction* (réaction en chaîne par polymérase)

Pi: Particules infectieuses

Pol III : ARN Polymérase de type III

Pol II: ARN Polymérase de type II

poly-A : polyadénylation

PPSE : Potentiel Post-Synaptique Excitateur

PPSI : Potentiel Post-Synaptique Inhibiteur

PS : « *Population Spike* » (sommation des PA d'un groupe de neurones)

PV+ : Interneurone exprimant la parvalbumine

qPCR : *quantitative Polymerase Chained Reaction* (réaction en chaîne par polymérase quantitative)

RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G

S1 : Cortex somatosensoriel

SCN1A: *Sodium Channel voltage gated type I alpha subunit* (Canal sodique dépendant du voltage de type 1, sous-unité alpha)

SD : Syndrome de Dravet

shARN : « *small hairpin* » ARN = petit ARN en épingle à cheveux

SIA : Segment Initial de l'Axone

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

SP : Stratum Pyramidale

SR : Stratum Radiata

tbp : *tata binding protein* (protéine de liaison tata)

TC : Thalamo-Cortical

TTX : Tétrodotoxine

UA : Unité Arbitraire

VB : Ventrobasal

WT: *Wild Type* (Sauvage)

ZE : Zone épileptogène

Introduction

Introduction générale

1. Epilepsie

- **Histoire de l'épilepsie**

L'épilepsie est loin d'être une maladie moderne, mais celle que nous connaissons aujourd'hui n'a pas toujours été considérée comme une pathologie réclamant des soins médicaux.

En effet, les textes retraçant les concepts fondamentaux concernant l'épilepsie remontent à des périodes datant d'au moins 2000 ans avant Jésus-Christ : le plus ancien document caractérisant de façon détaillée des symptômes de l'épilepsie est un manuel de médecine Babylonien composé de 26 tablettes, actuellement exposé au *British Museum* de Londres (Reynolds and Kinnier Wilson, 2008). Mais les croyances de l'époque attribuaient les symptômes de cette affection à une origine spirituelle, telle que la possession par un esprit malin ou un dieu malfaisant, ce qui engendrait des craintes et un isolement des personnes atteintes puisqu'elles étaient rejetées par la société.

Au V^e siècle avant Jésus-Christ, Hippocrate désacralise l'épilepsie dans son traité « La maladie sacrée », en l'attribuant à un dérèglement cérébral, dont les crises pouvaient être sujettes à un traitement tant qu'elles ne devenaient pas chroniques (Chang et al., 2007).

Malgré ces prémices, l'attribution surnaturelle de l'épilepsie ne laissa place à l'idée d'un déséquilibre cérébral pouvant être traité que bien plus tard, au XVIII^e et XIX^e siècle en Europe et aux Etats-Unis, où le premier médicament contre les crises (le bromure) commença à se répandre en 1857.

En 1873, **Hughlings Jackson**, un neurologue anglais, émit les premières hypothèses sur les mécanismes physiopathologiques liés à l'épilepsie, en supposant que l'expression des différentes crises observées dépendaient de l'emplacement dans le cerveau d'où partaient des décharges électrochimiques brutales d'énergie (Hogan and English, 2012).

Cette théorie s'est confirmée par la suite en 1924, grâce à la découverte de l'**électroencéphalogramme (EEG)** par le psychiatre Hans Berger (Tudor et al., 2005), qui a révélé l'existence d'ondes électromagnétiques correspondant à une activité électrique dans le cerveau, dont le profil variait lors des crises épileptiques et en fonction du placement des électrodes sur le crâne. Ce qui permis d'identifier des foyers d'où partaient ces décharges afin d'envisager des traitements chirurgicaux, dont les premiers furent réalisés par le Dr. Wilder Penfield (Hogan and English, 2012).

Depuis ces découvertes, la compréhension de l'épilepsie s'est largement accrue grâce à l'étude des mécanismes électrochimiques à l'origine des crises épileptiques et au développement de technologies d'imagerie cérébrale qui ont permis de déceler certains foyers épileptiformes (présentant des caractéristiques d'activités épileptiques) et de trouver des cibles thérapeutiques.

- **Définition de l'épilepsie**

L'épilepsie est l'affection neurologique la plus fréquente après la migraine. Elle touche plus de 1% de la population mondiale (*d'après les données du World Health Organisation, octobre 2014*), dont environ 750.000 personnes (1,13%) en France.

Il faut savoir que 5% des personnes feront une des convulsions isolées dans leur vie sans pour autant être épileptique, la différence avec l'épilepsie en tant que pathologie est due au fait qu'un patient épileptique aura des crises de manière récurrente.

Ces crises correspondent à une hyperexcitabilité paroxystique dues à des décharges excessivement anormales et simultanées de milliers de neurones et qui peuvent se manifester de différentes façons en fonction de la localisation du foyer épileptique dans le cerveau.

Ces épilepsies sont imprévisibles, ce qui leur vaut le nom tiré du grec ancien « *epilambanein* » qui signifie « prendre par surprise ». Elles représentent donc, en plus d'un problème de santé, un danger quotidien qui entrave l'indépendance des patients. De plus, 30% des épileptiques sont résistants aux traitements et la seule thérapie envisageable est alors l'ablation chirurgicale du foyer épileptique lorsque c'est possible. Mais cela peut entraîner de nombreuses séquelles irréversibles, d'où l'importance que prend la recherche dans ce domaine afin d'améliorer les conditions de vie de ces patients.

- **Caractérisation des crises**

La nature des crises épileptiques varie selon le foyer où sont générées les décharges anormales. On peut distinguer les crises partielles, pour lesquelles l'origine du dysfonctionnement est ciblée à une partie du cerveau, des crises généralisées qui vont toucher toutes les aires cérébrales, ou secondairement généralisées (qui commencent dans une partie cérébrale confinée, pour ensuite s'étendre aux deux hémisphères).

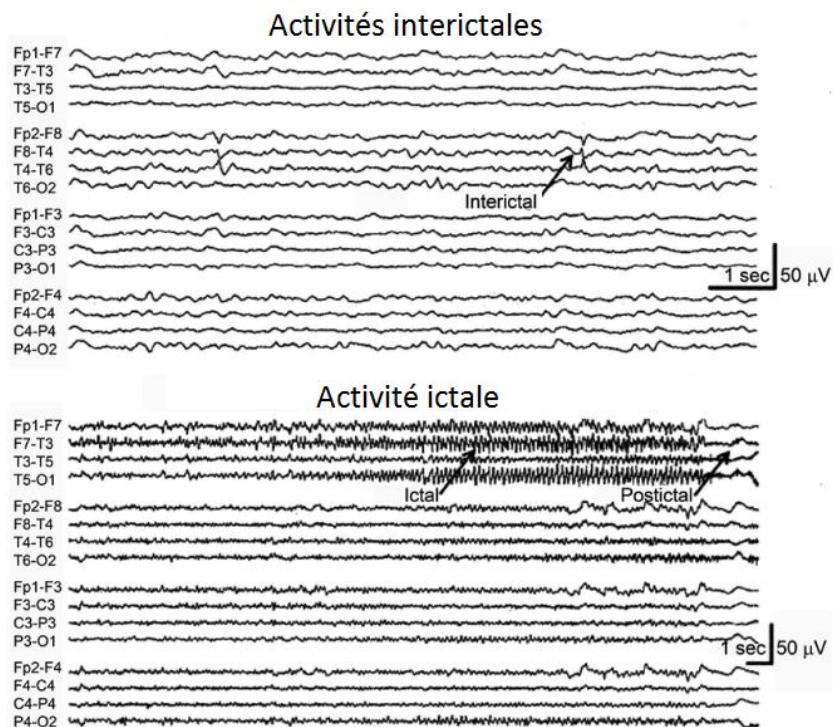
Parmi les crises partielles, on trouve des **crises partielles simples** qui entraînent des secousses des membres et parfois des hallucinations sensitives mais pas de perte de connaissance, contrairement aux **crises partielles complexes** qui touchent des zones plus larges, comprenant des structures profondes du cerveau qui régissent la conscience et dont le patient ne conserve aucun souvenir.

Il existe plusieurs types de **crises généralisées** en fonction des symptômes rencontrés ([Berg et al., 2010](#); [Jette et al., 2015](#)):

- **Crises toniques** : caractérisées par des contractures musculaires, un blocage respiratoire, une hypersalivation et une altération de la conscience.
- **Crises atoniques** : correspondant à une perte du tonus musculaire, entraînant des chutes et une très brève altération de la conscience.
- **Crises cloniques** : pour lesquelles les patients présentent des convulsions musculaires et des tremblements involontaires, ainsi qu'une perte de connaissance.

- **Crises tonico-cloniques ou Grand mal** : elles entraînent une totale perte de conscience et se caractérisent d'abord par une phase tonique (contraction musculaire prolongée) d'une dizaine de secondes, puis par une phase clonique (secousses musculaires) de l'ordre de la minute. Ces crises sont les plus impressionnantes et sont suivies d'une phase « post-épileptique » comateuse pouvant durer de quelques minutes à quelques heures. Durant cette phase, on observe une respiration bruyante et un relâchement musculaire entraînant souvent une incontinence. A son réveil, le patient ne conserve aucun souvenir de sa crise.
- **Crises myocloniques** : brèves secousses des membres par saccades n'entraînant pas d'altération de la conscience.
- **Crises d'absence** : plus souvent caractérisées chez l'enfant, elles correspondent à une brève suspension de la conscience qui se manifeste par une immobilité et un regard vague durant plusieurs secondes.

Des activités cérébrales spécifiques, peuvent être observées à l'aide d'un EEG au moment des crises, appelées **activités ictales**, et parfois on observe également de petites activités entre les crises, dites **activités interictales** (Fig.1).



Modifié d'après Fischer et al. 2014

Fig. 1 : Enregistrements EEG des activités cérébrales d'un patient épileptique. Les activités interictales sont enregistrées au niveau du lobe temporal de l'hémisphère droit (haut) et l'enregistrement d'une crise est représenté à un autre moment par une activité ictale au niveau du lobe temporal de l'hémisphère gauche (bas).

- **Causes de l'épilepsie**

Les causes de l'épilepsie peuvent être nombreuses, mais elles résultent toutes d'un déséquilibre dans la communication entre les réseaux neuronaux des circuits excitateurs (neurones Glutamatergiques principalement) et inhibiteurs (neurones GABAergiques principalement). Ce déséquilibre peut être du directement à une augmentation de l'excitation ou à un défaut d'inhibition qui engendrent des décharges épileptiques. Un certain nombre d'affections diminuent la résistance à lutter contre la propagation d'un excès de décharges électriques au sein des réseaux neuronaux, ce qui correspond à une baisse du seuil épileptogène responsable de crises épileptiques.

Le **déséquilibre de l'excitabilité cérébrale**, conduisant à l'épilepsie, peut être provoqué par des causes acquises (trauma crânien, AVC, infection, lésions cérébrales dues aux séquelles d'une souffrance lors d'une grossesse, de l'accouchement, ou des troubles développementaux...), ou par des causes dites idiopathiques lorsqu'on soupçonne l'implication de mutations génétiques qui doivent être recherchées, mais il reste cependant des épilepsies dont les causes sont inconnues ([pour revue: Thomas and Berkovic, 2014](#)). Certains facteurs peuvent également favoriser l'apparition de l'épilepsie, tels que l'âge (la survenue de l'épilepsie est plus fréquente durant la petite enfance ou après l'âge de 60 ans), les maladies vasculaires qui peuvent conduire à des dommages cérébraux, la démence, les crises fébriles durant l'enfance ([mayoclinic.org](#))... L'étiologie n'est pas toujours évidente, car l'expression de l'épilepsie étant due à une cause sous-jacente connue ou non, elle peut donc s'accompagner de l'expression d'autres symptômes ou pathologies ([Gaitatzis et al., 2004](#)). Dans certains cas, il est difficile de discerner si l'épilepsie est la cause ou l'effet, car il se peut qu'une cause sous-jacente ait provoqué les crises ainsi que d'autres troubles neurologiques, ou que la succession des crises ait pu engendrer les autres symptômes.

Le diagnostic clinique de l'épilepsie prend en compte le type de crises et leur récurrence, ainsi qu'un examen EEG pour confirmer une activité cérébrale anormale. Dans le cas où la cause est inconnue, un dépistage de certaines mutations génétiques peut être réalisé ([Fisher et al., 2014](#)).

- **Epilepsies génétiques**

La majorité des épilepsies était auparavant qualifiée d'idiopathiques car leur origine était inconnue ([Hauser and Kurland, 1975](#)), mais de nombreuses études ont récemment révélé l'implication de mutations génétiques dans les formes idiopathiques d'épilepsie ([Fig. 2](#)). En effet, plus de la moitié des épilepsies sont attribuées à une cause génétique ([Pour revues: Noh et al., 2012 et Thomas and Berkovic, 2014; Pal et al., 2010](#)) et peuvent être héréditaires, facilitant leur détection au sein de familles à haut risque. Elles peuvent aussi être dues à une mutation nouvelle, c'est-à-dire une mutation qui n'est pas présente dans le patrimoine génétique des parents et qui apparaît dans les gamètes d'un des deux parents, ou encore qui apparaît dans l'œuf fécondé. On parle alors de **mutation « de novo »**.

Les mutations peuvent être localisées sur un seul gène (monogénique ou mendélienne) ou sur plusieurs (polygénique), ou encore, dues à des mutations de l'ADN mitochondrial, à des troubles chromosomiques ou épigénétiques (Tafakhori et al., 2015; Thomas and Berkovic, 2014).

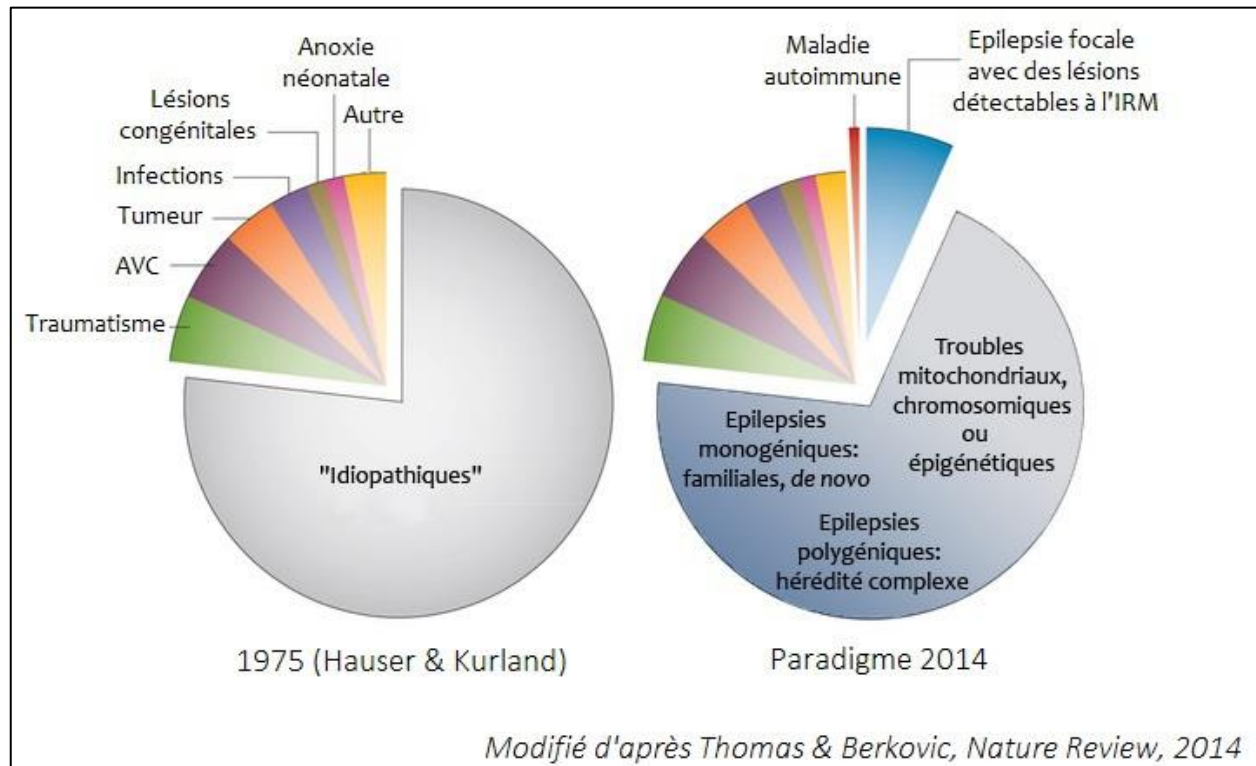


Fig. 2 : Avancées de la compréhension des causes de l'épilepsie. En 1975 (gauche), la majorité des crises étaient qualifiées « d'idiopathiques », alors qu'en 2014 (droite) de nouvelles causes ont été découvertes, telles que les épilepsies dues à des maladies auto-immunes ou celles dont les lésions sont uniquement détectables par IR ; quant à la majorité des épilepsies, elles sont suspectées d'avoir des causes génétiques.

L'identification de mutations sur certains gènes qui provoquent une augmentation de l'excitabilité des réseaux neuronaux, a révélé leur implication dans ces formes d'épilepsies (Steinlein, 2001, 2002). La majorité de ces mutations touchent des gènes codant pour les canaux ioniques, tels que les canaux potassiques, les récepteurs de l'acétylcholine, les canaux calciques, les canaux chloriques, les récepteurs GABAergiques, ou assez fréquemment les **canaux sodiques (Na_v)** (Mantegazza et al., 2010a; Noh et al., 2012; Guerrini et al., 2014; Bechi et al., 2015).

Avant d'exposer ces mécanismes en détails, nous allons tout d'abord faire un rappel sur la communication neuronale et la fonction des canaux impliqués dans cette hyperexcitabilité.

2. Communication neuronale

- **Physiologie du neurone**

Le neurone est une cellule excitable spécialisée dans la transmission de l'information. Il est constitué d'un corps cellulaire qui contient le noyau, des dendrites qui se divisent telles les branches d'un arbre et permettent de recevoir l'information provenant des autres neurones, d'un axone très long qui génère et propage l'information du corps cellulaire jusqu'aux terminaisons axonales (Fig. 3). L'information est générée au niveau du **segment initial de l'axone (SIA)** sous forme de signal électrique, puis est propagée le long de l'axone. La majorité des neurones possède des gaines de myéline, permettant d'isoler l'axone et de rendre la propagation du signal électrique plus rapide. Les terminaisons axonales forment des zones de contact avec d'autres neurones, appelées « **synapses** ». Ces terminaisons pré-synaptiques contiennent des vésicules remplies de composés chimiques appelés « **neurotransmetteurs** » qui sont libérés lorsque le signal électrique arrive à leur niveau. Les neurotransmetteurs vont ensuite se fixer sur des récepteurs présents sur la membrane du neurone qui reçoit l'information (post-synaptique) afin d'activer des protéines membranaires appelées « **canaux ioniques** » permettant l'entrée d'ions (particules chargées électriquement) dans le neurone.

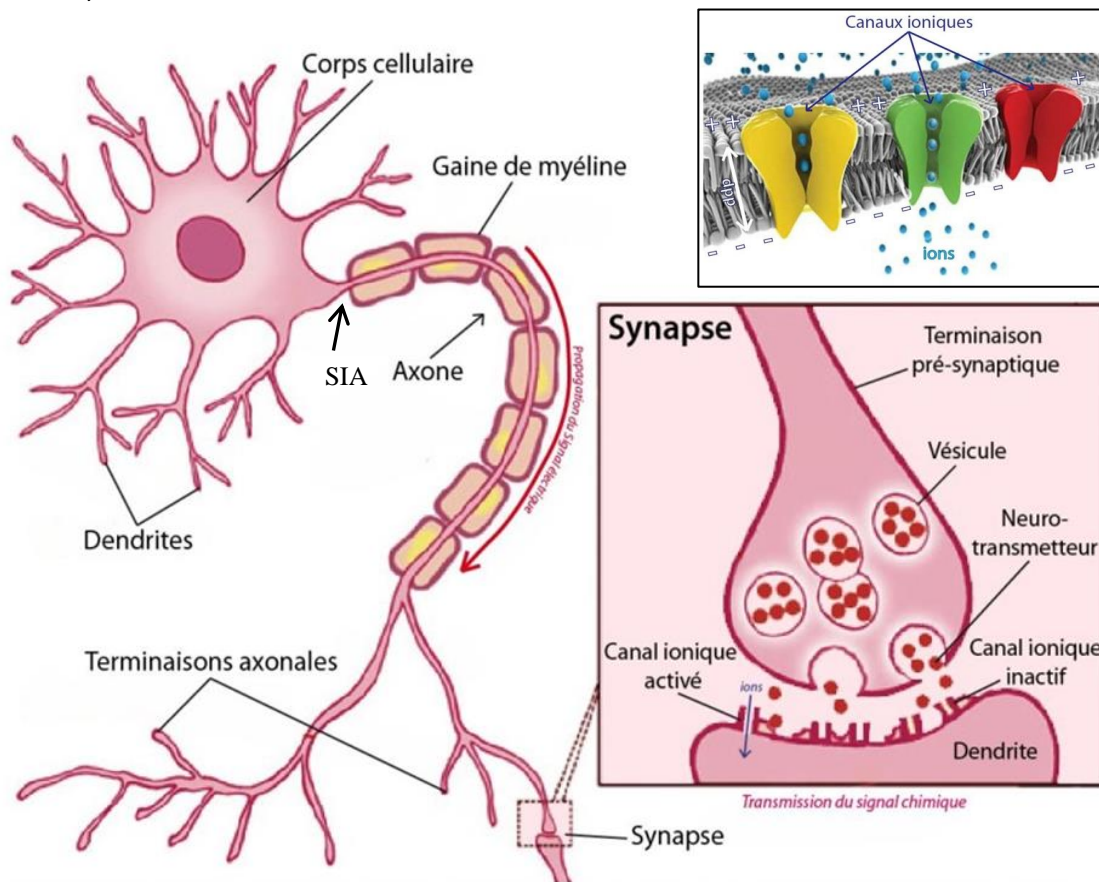


Fig. 3 : Anatomie du neurone. Dessin représentatif d'un neurone composé d'un corps cellulaire, de dendrites, d'un axone et de terminaisons axonales. Une connexion synaptique est également représentée (synapse) ainsi que les canaux ioniques (haut droite).

La génération et la propagation de signaux électriques est due au fait que les neurones sont des cellules polarisées. En effet, différents types d'ions sont répartis de part et d'autre de la membrane du neurone (membrane plasmique). Par exemple, à l'état de repos l'intérieur du neurone (milieu intracellulaire) contient moins d'ions sodiques (Na^+), plus d'ions potassiques (K^+) et moins d'ions calciques (Ca^{2+}) que le milieu extracellulaire (Fig. 4). A l'état de repos les canaux potassiques de fuite sont les principaux à être ouverts en permanence. Ces canaux laissent les ions K^+ diffuser selon leur gradient de concentration, c'est-à-dire du compartiment où ils sont le plus concentré (intracellulaire) vers le moins concentré (extracellulaire). Certains canaux sodiques de fuite sont également ouverts en permanence, laissant entrer des ions Na^+ dans le neurone, cependant ils n'influencent pas la polarité de la membrane car celle-ci est 40 fois moins perméable aux ions Na^+ , qu'aux ions K^+ .

La fuite du K^+ vers l'extérieur de la cellule est donc beaucoup plus importante que l'entrée de Na^+ , générant un excès de charges positives qui s'accumulent au niveau de la membrane extracellulaire et une accumulation de charges négatives au niveau de la membrane intracellulaire. Ce phénomène génère une **différence de potentiel (ddp)** entre les deux compartiments.

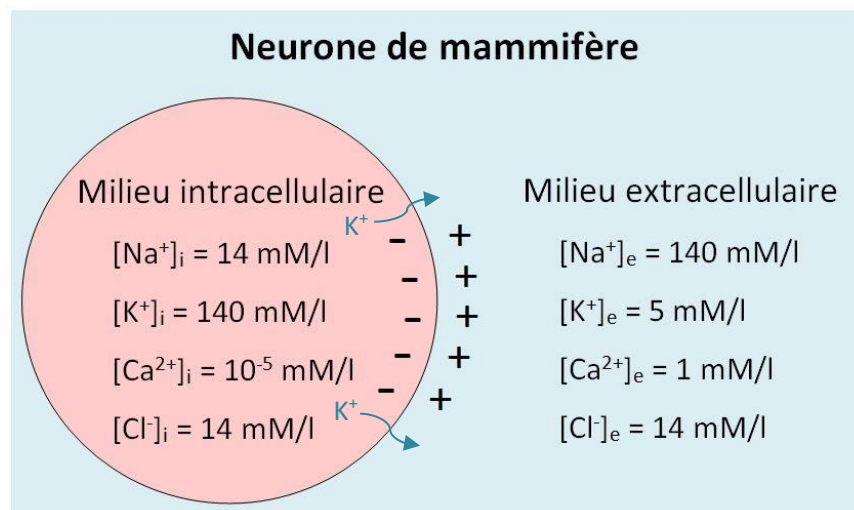


Fig. 4 : Représentation schématique de la polarité d'un neurone à l'état de repos.
La concentration intracellulaire et extracellulaire des différents ions et la perméabilité de la membrane aux ions potassiques (K^+) génèrent un flux sortant de charges positives, chargeant la membrane extracellulaire positivement et la membrane intracellulaire négativement.

Au fur et à mesure que la ddp augmente, la force électrique s'oppose au flux d'ions K^+ généré par le gradient de concentration. Lorsque la ddp atteint une valeur stoppant le flux d'ions K^+ à travers la membrane ($\approx -80 \text{ mV}$), on parle alors de potentiel de repos ou potentiel de membrane.

Cette polarité associée à la présence de canaux sodiques dépendants du voltage (Na_v) permet au neurone d'être une cellule excitable, car lorsqu'un neurone perçoit un signal chimique exciteur au niveau de ses dendrites, cela provoque l'ouverture des canaux ioniques permettant une entrée massive d'ion Na^+ , inversant transitoirement et localement le potentiel de membrane. On parle alors de **dépolarisation**. Si celle-ci est suffisamment importante et se propage au corps cellulaire, elle va permettre l'ouverture d'un grand

nombre de canaux Na_v , entraînant une entrée encore plus massive d'ions Na^+ au niveau du SIA, déclenchant une vague d'entrée et de sortie d'ions Na^+ se propageant tout le long de l'axone, appelée « **Potentiel d'Action** » (**PA**) ou « influx nerveux ». Lorsque le PA arrive au niveau de la terminaison axonale, elle va provoquer la fusion des vésicules synaptiques à la membrane (exocytose) libérant ainsi les neurotransmetteurs qui agiront sur le neurone suivant.

Les animaux sont les seuls organismes à avoir développé cette capacité de communication rapide entre cellules qu'est la communication neuronale (Hille, 1989). Cette communication correspond à un équilibre entre les neurones excitateurs qui transmettent l'information aux autres neurones et les neurones inhibiteurs (ou interneurons) qui donnent la priorité à certaines informations par rapport à d'autres. En effet, le signal chimique reçu au niveau des dendrites du neurone n'a pas la même incidence s'il provient d'un neurone excitateur ou inhibiteur :

- Lorsque le neurone pré-synaptique est excitateur, il y a génération d'un **potentiel post-synaptique excitateur (PPSE)** au niveau des dendrites du neurone post-synaptique, causé par l'entrée massive de cations sodium (Na^+) et provoquant une dépolarisation de sa membrane. Si le neurone reçoit une quantité suffisante de signaux excitateurs, le seuil de dépolarisation est alors suffisant pour générer un PA qui se propage le long de la synapse. Cet influx provoque la libération de neurotransmetteurs qui iront activer la cascade de signaux électriques du neurone suivant.
- Lorsque le neurone pré-synaptique est inhibiteur, il y a génération d'un **potentiel post-synaptique inhibiteur (PPSI)** au niveau de la membrane du neurone post-synaptique, causé par l'entrée massive d'anions chlorure (Cl^-). Cette entrée de charges négatives hyperpolarise la membrane, rendant ainsi le neurone moins activable par des neurones excitateurs.

Les neurones excitateurs, majoritairement **glutamatergiques**, synthétisent et libèrent du glutamate (neurotransmetteur excitateur) au niveau de la synapse, permettant de transmettre l'information grâce à la propagation de l'influx nerveux aux autres neurones. Les neurones inhibiteurs (ou interneurons) majoritairement **GABAergiques**, synthétisent et libèrent de l'acide γ -aminobutyrique ou GABA (neurotransmetteur inhibiteur) au niveau de la synapse et freinent ainsi l'influx nerveux en hyperpolarisant les neurones.

Il existe de nombreux types de neurones qui diffèrent en fonction de leur taille, polarité, structure, ou fonction. Nous nous sommes intéressés à deux différents sous-types de neurones inhibiteurs en forme de panier (*basket cells*) : les **interneurones exprimant la parvalbumine (PV+)** et les **interneurones exprimant la cholécystokinine (CCK+)**. Ces neurones ciblent tous deux le corps cellulaire des neurones excitateurs « **pyramidaux** » (appelés ainsi de par leur forme triangulaire), sur lesquels ils ont pourtant une action différente en fonction de leur patron de décharge (Fig. 5). En effet, les interneurons PV+ déchargent de manière très rapide (*fast spiking*), alors que les interneurons CCK+ ont un patron de décharge plus lent (*regular spiking*) (Freund, 2003). Leurs caractéristiques spécifiques leur permettent de participer différemment aux rythmes neuronaux, contribuant par exemple aux différentes oscillations électromagnétiques (correspondant à des fréquences d'activités cérébrales) enregistrées au niveau du réseau hippocampique (Klausberger et al., 2005).

Alors que d'anciennes études avaient montré que la cholecystokinine (CCK), libérée par les neurones CCK+, permettait d'augmenter l'excitabilité des neurones excitateurs et inhibiteurs (Miller et al., 1997; Gallopin et al., 2006), de plus récentes études ont révélé qu'elle pouvait avoir une action différente en fonction des sous-types cellulaires. Plus précisément, la CCK augmente l'excitabilité des interneurons PV+, alors qu'elle a indirectement un effet contraire sur les interneurons CCK+. En effet, elle provoque la libération d'endocannabinoïdes qui se fixent sur leurs récepteurs CB1 localisés sur les neurones CCK+ et induit une inhibition rétrograde de la libération de GABA par ces derniers. Ce mécanisme permet de renforcer l'action inhibitrice des neurones PV+ qui ont une fenêtre d'action plus rapide que les neurones CCK+. L'explication de cette action paradoxale de la CCK vient de son récepteur CCK2, qui est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), permettant d'activer des cascades intracellulaires différentes en fonction des sous-types neuronaux. En effet, les protéines G couplées au récepteur CCK2 dans les interneurons PV+ induiront la dépolarisation de ces neurones, alors que d'autres types de protéines G activeront une cascade de signalisation aboutissant à la libération d'endocannabinoïdes par les neurones pyramidaux (Földy et al., 2007; Lee et al., 2011).

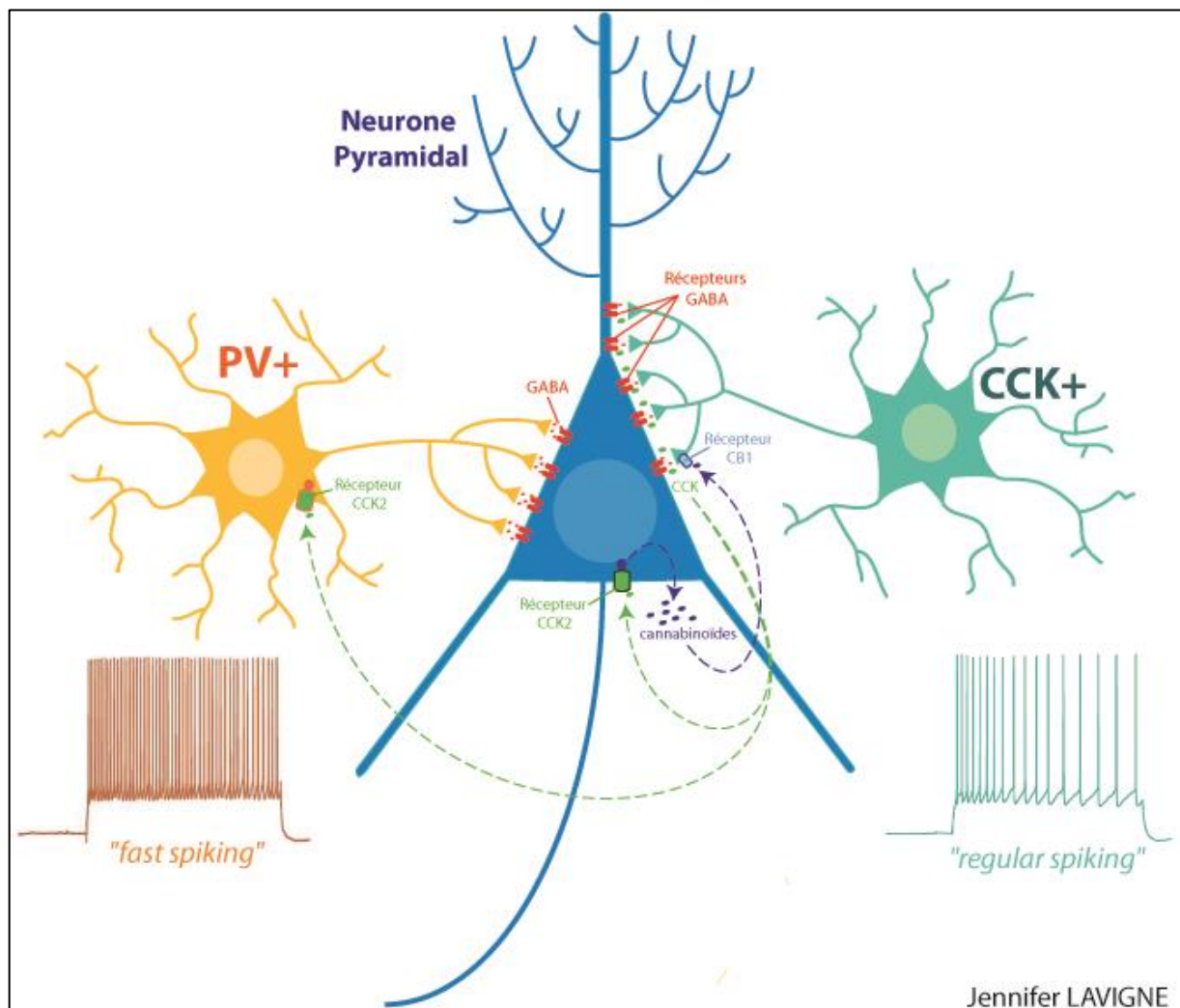


Fig. 5 : Représentation schématique de l'interaction d'un neurone pyramidal avec un interneurone à parvalbumine (PV+) et avec un interneurone à cholécystokinine (CCK+). Le patron de décharge de l'interneurone PV+ est plus rapide (« fast spiking ») que celui de l'interneurone CCK+ (« regular spiking »).

- **Canaux sodiques**

Les principaux acteurs de la communication neuronale sont les canaux sodiques (Na_v), dont il existe deux grandes classes :

- Canaux sodiques de fuite insensibles aux variations de potentiels
- **Canaux sodiques voltages-dépendants (Na_v)** qui s'activent ou s'inactivent en fonction des variations du potentiel de membrane. Ce sont ces canaux qui permettent la génération et la propagation de l'influx nerveux.

Nous nous intéressons plus particulièrement au deuxième type.

1) Fonction

Les canaux Na_v sont localisés au niveau la membrane des cellules excitables (telles que les cellules nerveuses ou musculaires) où ils permettent l'entrée du sodium (Na^+) de façon très sélective lorsqu'ils sont activés, générant ainsi un flux électrique. Ils sont particulièrement importants puisqu'ils sont les principaux acteurs de l'excitabilité neuronale, faisant d'eux une cible thérapeutique de choix pour le traitement des épilepsies (Mantegazza et al., 2010b). Ils jouent un rôle essentiel dans la génération et la propagation des signaux électriques dans les cellules excitables, et plus particulièrement les neurones : ils permettent l'entrée de Na^+ dans le neurone, diminuant ainsi la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane (**dépolarisation**), jusqu'à un seuil déclenchant une entrée plus massive de Na^+ par les canaux Na_v localisés au niveau du segment initial de l'axone, d'où est donc généré un influx nerveux (ou PA). D'autres canaux Na_v permettront ensuite la propagation de ce signal grâce à des échanges ioniques le long de l'axone jusqu'à la synapse, où ils permettent le déclenchement de la cascade conduisant à la communication chimique, via les neurotransmetteurs. La [figure 6](#) montre un exemple de la propagation du PA par la conduction des courants sodiques au travers des nœuds de Ranvier (conduction saltatoire) d'un neurone exciteur, allant du corps cellulaire jusqu'aux boutons synaptiques :

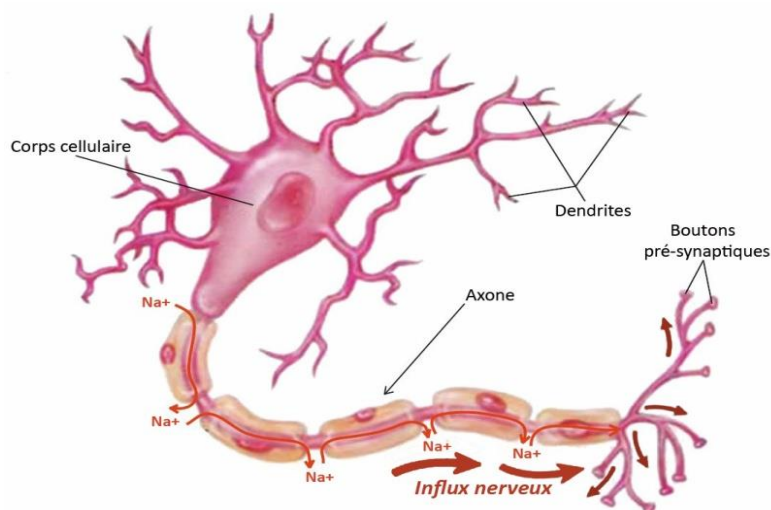


Fig. 6 : Conduction saltatoire de sodium. Représentation de la conduction saltatoire des courants sodiques le long de l'axone, permettant la propagation de l'influx nerveux.

2) Structure

Les canaux Na_v sont constitués d'une sous-unité principale α , qui est suffisante pour assurer au canal sa fonction et d'une ou plusieurs petites sous-unités β , qui peuvent moduler l'expression du canal à la membrane, la dépendance au potentiel électrique et la cinétique de la sous-unité α (Yang and Horn, 1995; Yang et al., 1996, 1997; Marban et al., 1998; Catterall, 2012).

La **sous-unité α** est constituée de quatre domaines homologues (I à IV), chacun composé de 6 segments transmembranaires reliés les uns aux autres par des boucles intra- et extracellulaires (Fig. 7). Les quatre domaines se replient ensemble de manière à former un canal fonctionnel sélectif aux ions Na^+ (Marban et al., 1998; Meisler and Kearney, 2005).

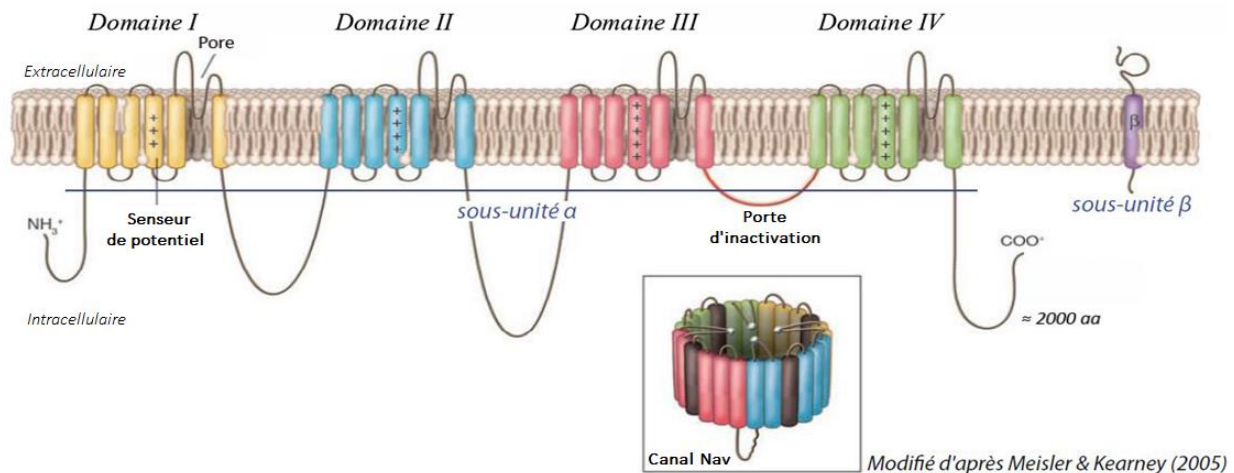


Fig. 7 : Représentation de la structure d'un canal sodique dépendant du voltage (Na_v) à travers la membrane plasmique. La sous-unité α est constituée de 4 domaines (chacun composés de 6 segments transmembranaires) qui se replient pour former un canal. La sous-unité β composée d'un seul segment transmembranaire permet de moduler la fonction de la sous-unité α .

Les **segments 5 et 6** de chaque domaine forment le pore du canal (Yellen et al., 1991) et permettent donc la sélectivité aux ions Na^+ .

Les **segments 4** constituent les senseurs de potentiel du pore, permettant son ouverture. En effet, lors de la dépolarisation de la membrane, ces segments chargés positivement se déplacent vers le milieu extracellulaire : ce mouvement change la conformation des segments 5 et 6, induisant l'ouverture du pore qui permet l'entrée d'ions sodium (Na^+) dans la cellule qui vont suivre leur gradient électrochimique (Noda et al., 1984; Stühmer et al., 1989; Yang et al., 1996).

La région intracellulaire entre les domaines III et IV permet l'inactivation rapide du canal, ce qui lui vaut le nom de « porte d'inactivation » (Stühmer et al., 1989; pour revue: Catterall, 2000).

Ces différents segments permettent donc au canal Na_v d'adopter différents états conformationnels (Fig. 8) :

- Fermé : imperméable aux ions, il peut être activé immédiatement
- Ouvert : il est alors activé et perméable aux ions Na^+
- Inactivé : il est ouvert, mais son activation est suivie par une période réfractaire due à la porte d'inactivation qui bouche le pore, le rendant imperméable aux ions. Les canaux vont ensuite se refermer et revenir à un état de repos jusqu'à la prochaine activation.

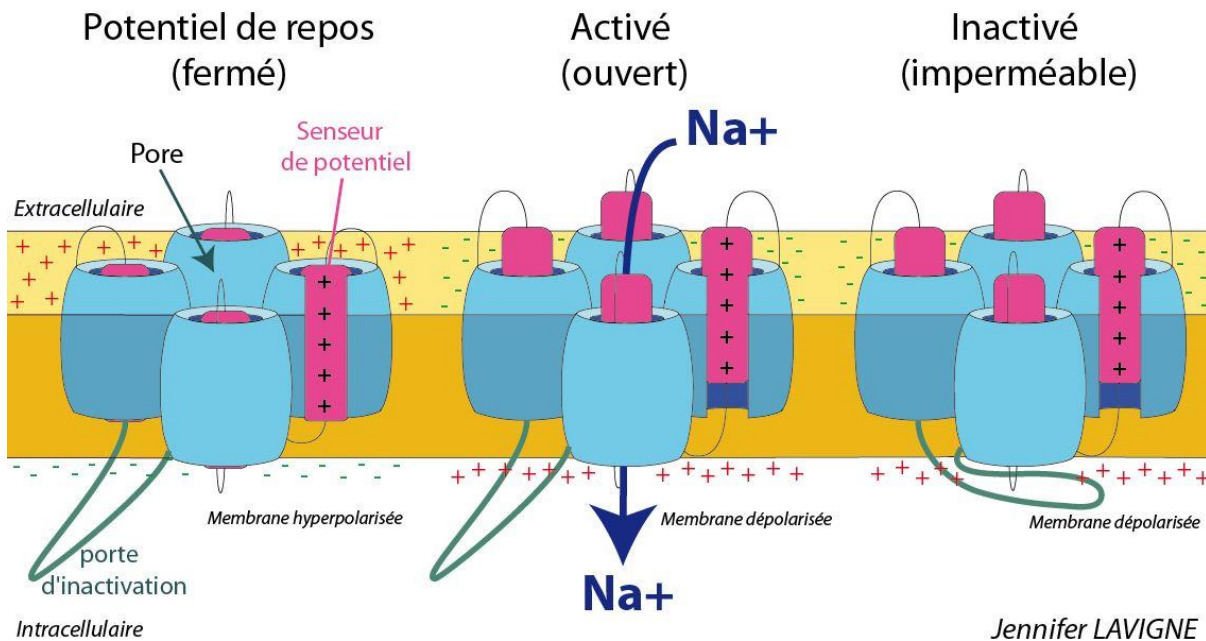


Fig. 8 : Représentation schématique des différents états conformationnels des canaux Na_v . Au potentiel de repos le canal est fermé et activable (gauche). Lors d'une dépolarisation de la membrane le canal s'ouvre et permet l'entrée d'ions Na^+ (milieu). La porte d'inactivation va ensuite bloquer le port du canal au niveau intracellulaire le rendant imperméable aux ions et inactivable jusqu'à repolarisation de la membrane (droite).

Jennifer LAVIGNE

Il existe 9 isoformes des canaux sodiques Na_v qui diffèrent de par leur homologie de séquence au niveau de la sous-unité α , de leur localisation, de leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX) et de leur localisation chromosomique (Fig. 9).

Sous-unité α	Gène	Localisation chromosomique	Sensibilité à la TTX	Localisation tissulaire
$Na_v1.1$	<i>Scn1a</i>	2	Sensible	SNC, SNP, muscle cardiaque
$Na_v1.2$	<i>Scn2a1</i>	2	Sensible	SNC
$Na_v1.3$	<i>Scn3a</i>	2	Sensible	SNC (embryonnaire)
$Na_v1.4$	<i>Scn4a</i>	11	Sensible	muscle squelettique
$Na_v1.5$	<i>Scn5a</i>	9	Résistant	muscle cardiaque
$Na_v1.6$	<i>Scn8a</i>	15	Sensible	SNC, SNP, glie, nœuds de Ranvier
$Na_v1.7$	<i>Scn9a</i>	2	Sensible	SNP, cellules de Schwann
$Na_v1.8$	<i>Scn10a</i>	9	Résistant	SNP (neurones sensoriels)
$Na_v1.9$	<i>Scn11a</i>	9	Résistant	SNP

Fig. 9 : Tableau représentant les propriétés des différents isoformes des canaux Na_v chez la souris. Représentation du gène, de la localisation chromosomique, de la sensibilité à la TTX et de la localisation tissulaire correspondant à chaque isoforme de canal Na_v (inspiré de Goldin, 2002; Malhotra et al., 2001; Ogata and Ohishi, 2002).

- **Canaux sodiques $Na_v1.1$**

De nombreuses études réalisées ont montré que parmi ces canaux sodiques voltages-dépendants, l'**isoforme $Na_v1.1$** (sous-unité α de type I des canaux sodiques voltages dépendants) joue un rôle dans certaines épilepsies génétiques (pour revue: Catterall et al., 2010).

Chez les rongeurs comme chez l'homme, les canaux sodiques $Na_v1.1$ sont des protéines d'environ 230 kDa codées par le gène *SCN1A* localisé sur le chromosome 2 à la position 24.3 (2q24.3). Ils sont localisés au niveau des cellules musculaires cardiaques (Malhotra et al., 2001) et du Système Nerveux Central (SNC) (Vacher et al., 2008), où ils jouent un rôle important dans l'excitabilité du réseau neuronal puisque plus de 200 mutations de ce gène sont associées au développement de syndromes épileptiques chez l'homme (pour revue: Ragsdale, 2008). Auparavant, les canaux $Na_v1.1$ avaient été décrits comme ayant une localisation somato-dendritique dans le SNC (Westenbroek et al., 1989). Cependant, il a été montré par la suite que ces canaux sont également exprimés en grande quantité au niveau du segment initial de l'axone (SIA) (Van Wart et al., 2007) et des nœuds de Ranvier (Duflocq et al., 2008), participant ainsi à la génération et à la propagation des PA le long de l'axone.

De nombreuses études s'accordent à dire que les mutations entraînant une « **perte de fonction** » de ce canal favorisent le développement de certaines épilepsies (Claes et al., 2001; Escayg et al., 2000). On peut donc se demander comment une diminution de l'activité des canaux $Na_v1.1$, agglomérés au niveau du SIA et des

noëuds de Ranvier et participant donc à la génération et à la propagation des PA, peut engendrer une hyperexcitabilité cérébrale aboutissant à des crises convulsives ?

Par ailleurs d'autres études ont soutenu l'hypothèse selon laquelle les mutations de ces canaux pouvaient engendrer une augmentation de l'excitabilité des neurones. Il existe à la fois des mutations gain et perte de fonction des canaux Na_v1.1, pouvant donc augmenter ou diminuer l'excitabilité du neurone, mais conduisant toutes à l'augmentation de l'excitabilité cérébrale observée dans les syndromes épileptiques. Toutefois, il semble que la majorité des mutations Na_v1.1 conduise à des pertes de fonction (pour revue : Mantegazza, 2011).

Ce paradoxe s'explique par le fait que les canaux Na_v1.1 sont majoritairement exprimés au niveau des neurones inhibiteurs (Yu et al., 2006; Kalume et al., 2007; Martin et al., 2010) et sont donc les acteurs essentiels de l'excitabilité de ce sous-type neuronal. Les premières études ayant soutenu cette théorie ont montré que les canaux Na_v1.1 sont fortement exprimés dans le SIA des interneurones à parvalbumine (PV+), alors qu'ils le sont à des niveaux beaucoup plus faibles dans les neurones pyramidaux (Ogiwara et al., 2007) et qu'ils jouent donc un rôle essentiel dans l'excitabilité des neurones GABAergiques (Yu et al., 2006). Cette hypothèse a par la suite été confirmée par de plus récentes études (Cheah et al., 2012; Dutton et al., 2013; Higurashi et al., 2013). Ces résultats suggèrent donc que les mutations du canal Na_v1.1 induisant une perte de fonction, provoquent une réduction du courant sodique de ces canaux (Rhodes et al., 2005), ce qui génère un dysfonctionnement des réseaux neuronaux inhibiteurs dans le cerveau et crée de ce fait un contexte favorable à la génération de crises (pour revue: Ragsdale, 2008; Guerrini et al., 2014).

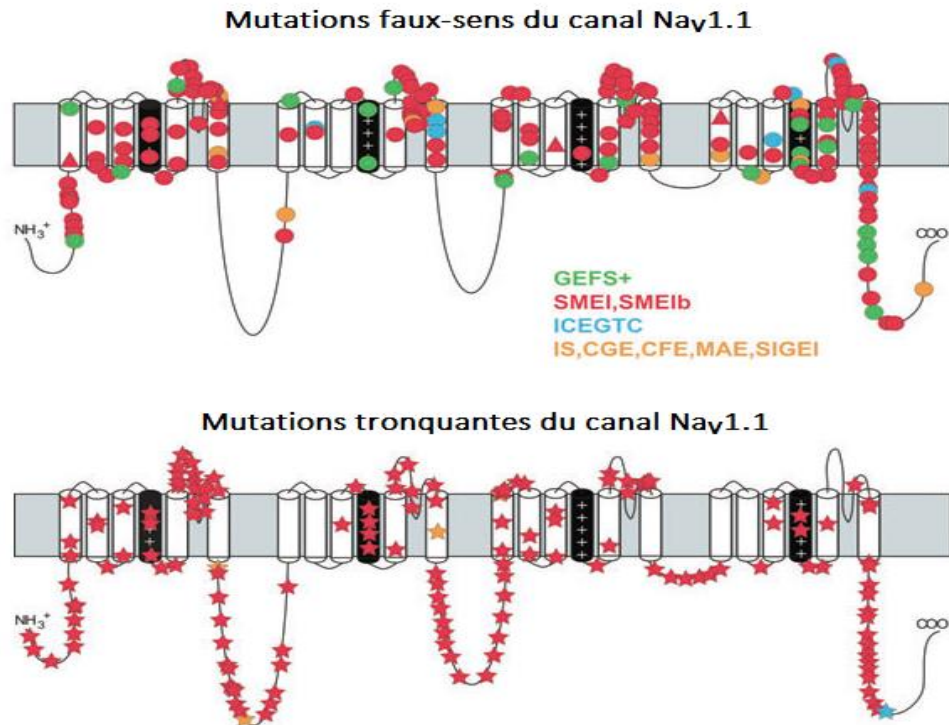
3. Pathologie humaine : Epilepsies liées aux mutations du canal Na_v1.1

- **Généralités**

De nombreuses mutations sur un seul gène, codant pour des canaux ioniques ou des récepteurs, peuvent être à l'origine de l'apparition des formes idiopathiques d'épilepsies.

Les mutations des canaux Na_v impactent fortement l'excitabilité neuronale et sont donc particulièrement impliquées dans l'épilepsie génétique. De nombreuses études ont révélées que des mutations du gène **SCN1A**, situé sur le chromosome 2q24 (OMIM 182389) et qui code pour la sous-unité α du canal sodique voltage dépendant **Na_v1.1**, engendraient l'apparition d'épilepsies génétiques accompagnées de crises fébriles « Plus », signifiant que les crises convulsives provoquée par la fièvre persistent au-delà de l'âge de 6 ans chez les enfants épileptiques porteurs de ces mutations (Claes et al., 2001; Escayg et al., 2000, 2001; Mantegazza et al., 2005; Meisler and Kearney, 2005; Mulley et al., 2005; Rhodes et al., 2005; Catterall et al., 2010). Un grand nombre de mutations du gène *Scn1a*, qu'elles soient faux-sens (remplacement d'un nucléotide par un autre) ou induisant une troncation du canal Na_v1.1 (mutation non-sens générant un codon « stop »), provoquent un phénotype épileptique (Fig. 10), révélant le rôle essentiel de ce canal dans l'excitabilité cérébrale.

Parmi les patients épileptiques dont le séquençage génétique a révélé des mutations du gène *SCN1A*, il n'y a qu'un seul allèle affecté et les modèles animaux ont montré que la plupart des mutations homozygotes sont létales (pour revue: Catterall et al., 2010).



Modifiée d'après Catterall et al., 2010

Fig. 10 : Mutations du canal Na_v1.1 observées chez des patients épileptiques.

En haut, les mutations faux-sens sont représentées (cercles) ainsi que quelques mutations conduisant à la délétion d'un codon (triangle). En bas les mutations aboutissant à la troncation du canal sont représentées (étoiles). La caractérisation clinique des épilepsies possédant ce type de mutations est représenté par un code couleur : vert = épilepsie généralisée avec convulsions fébriles Plus (EGCF+), rouge = syndrome de Dravet (SD), bleu = épilepsie généralisée idiopathique de l'enfance avec crises tonico-cloniques, jaune = autres épilepsies génétiques de l'enfance.

Parmi les formes épileptiques dues à la mutation du canal Na_v1.1, on retrouve les **Epilepsies Généralisées avec Convulsions Fébriles Plus (EGCF+)**, caractérisées principalement par des convulsions apparaissant chez de jeunes enfants lors des premières fièvres et qui persistent après l'âge de 6 ans (ce qui lui vaut le nom de « convulsions fébriles plus »), mais également par des phénotypes bénins très variés, tels que des crises tonico-cloniques, myocloniques, d'absence ou des crises atoniques (Steinlein, 2001).

Il existe une variante du spectre des EGCF+ avec un phénotype plus sévère, anciennement appelé « **Epilepsie Myoclonique Sévère du Nourrisson** » (EMSN), puis renommée « **Syndrome de Dravet** » (SD) en 1989. Dans ce syndrome, la mutation *de novo* du canal Na_v1.1 est associée à une anomalie de l'EEG et à l'apparition dans les premiers mois de vie de violentes crises fébriles cloniques, myocloniques ou partielles (Claes et al., 2001).

D'autres symptômes apparaissent au cours du développement tels que des retards mentaux, des troubles comportementaux et sociaux ou des ataxies ([Dravet, 2011](#); [Akiyama et al., 2012](#)).

Dans ces syndromes épileptiques, les mutations hétérozygotes du gène *Scn1a* impactent l'excitabilité des interneurons GABAergiques dont résulte une hyperexcitabilité au sein du réseau neuronal ([Yu et al., 2006](#)).

- **Epilepsies Généralisées avec Convulsions Fébriles Plus (EGCF+)**

En 1997, l'étude d'une grande famille multiplex (famille dont plusieurs membres sont atteints par une maladie) a permis aux Dr Scheffer et Berkovic de décrire un syndrome épileptique héréditaire, présentant une grande variabilité phénotypique inter- et intrafamiliale, qu'ils ont appelé « Epilepsie Généralisée avec Convulsions Fébriles Plus » (EGCF+). L'apparition de crises convulsives suite à une augmentation de fièvre est communément observée dans ce syndrome entre l'âge de 6 mois et 6 ans, mais elles persistent au-delà de cet âge avec ou sans présence de fièvre ([Scheffer and Berkovic, 1997](#)). L'apparition de convulsions fébriles affecte environ 2 à 6% des enfants en bas âge (avant 6 ans), mais la récurrence de ces crises n'affecte que 40% d'entre eux. Seulement 2 à 12% d'entre eux développent une épilepsie chronique par la suite ([pour revues: Baulac et al., 2004; Camfield and Camfield, 2015](#)).

Le diagnostic se fait généralement suite à la récurrence des crises fébriles au-delà de l'âge 6 ans. Le médecin peut alors choisir de faire une investigation au sein de la famille du patient pour savoir s'il y a déjà eu d'autres cas parentés avant de rechercher une mutation génétique. Le diagnostic EEG ne présente généralement aucune anomalie en dehors de la période de crises récurrentes ([#Epilepsy foundation](#)).

Les symptômes se caractérisent le plus fréquemment par l'association de crises fébriles et afebriles qui persistent au-delà de l'âge de 6 ans, exprimées par un large spectre clinique qui regroupe des crises d'absence, myocloniques, toniques, tonico-cloniques, atoniques ou partielles (moins fréquentes que les crises généralisées). Cependant, les crises afebriles peuvent parfois apparaître sans crises fébriles au préalable ([pour revue: Baulac et al., 2004](#)). Généralement, ces crises sont contrôlées par des traitements antiépileptiques et disparaissent à l'adolescence pour la plupart des patients, cependant certains développent des déficiences mentales.

Le syndrome d'EGCF+ est dû à des mutations génétiques autosomiques dominantes, pouvant affecter différents gènes avec une pénétrance de l'ordre de 70-80% ([pour revue: Baulac et al., 2004](#)) et générant une multitude de symptômes, ce qui permet de classer ce syndrome en différents types. Les plus répandus sont le type 1 affectant gène *Scn1b* ([OMIM 604233](#)), le type 2 affectant gène *Scn1a* ([OMIM 604403](#)) et le type 3 affectant gène *GABRG2* ([OMIM 611277](#)) ; mais il existe jusqu'à 9 types d'EGCF+ répertoriés sur le site [OMIM](#).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'**EGCF+ de type 2**, pour lequel des études ont montré l'implication de mutations hétérozygotes du gène *Scn1a*, codant pour la sous-unité α du canal sodique $\text{Na}_v1.1$ (Escayg et al., 2000, 2001; Claes et al., 2004; Mantegazza et al., 2005; pour revue: Baulac et al., 2004; Guerrini et al., 2014). Deux mutations ont été mises en évidence sur ce gène dans l'étude menée par le Dr Escayg en 2000, correspondant à des substitutions d'acides aminés (T875M et R1648H) (Escayg et al., 2000), provoquant la mutation du canal $\text{Na}_v1.1$ au niveau du segment transmembranaire S4 des domaines II et IV respectivement (Baulac et al., 2004) (Fig. 11). Les patients portant la mutation R1648H expriment un phénotype plus sévère, avec des crises généralisées plus fréquentes que ceux portant la mutation T875M (Escayg et al., 2000). C'est pour cela que nous avons choisi d'étudier un modèle murin portant la mutation **R1648H** au sein du laboratoire, reproduisant ainsi la pathologie EGCF+ de type 2.

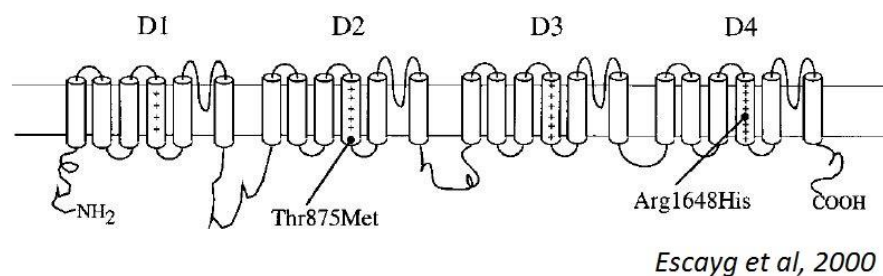


Fig. 11 : Deux mutations conduisant à l'épilepsie EGCF+ de type 2. Les mutations T875M et R1648H se trouvent respectivement sur les segments 4 (S4) des domaines 2 (D2) et 4 (D4).

• Syndrome de Dravet (SD)

Il existe une variante du spectre des EGCF+ exprimant un phénotype très sévère (Singh et al., 2001). Initialement appelé « **Epilepsie Myoclonique Sévère du Nourrisson** » (EMSN), ce syndrome a été décrit pour la première fois en France en 1978 par le Dr. Charlotte Dravet et fût ensuite renommé « **Syndrome de Dravet** » (SD) en 1989 après une caractérisation plus détaillée des symptômes (Dravet et al., 2005).

Ce syndrome se manifeste durant la première année de vie par l'apparition de violentes crises pouvant être cloniques, myocloniques ou partielles. Ces crises sont souvent prolongées, généralisées et associées à de la fièvre. En grandissant, les enfants atteints du SD peuvent développer une diversité de crises fébriles et afebriles, telles que des crises myocloniques, tonico-cloniques, des crises d'absences, pouvant être généralisées ou partielles (*classification ILAE*). Ils développent également d'autres symptômes à partir de l'âge de deux ans, tels que des troubles du développement, des ataxies (manque de coordination des mouvements) et des déficits sociaux et cognitifs (Singh et al., 2001; Dravet, 2011; Akiyama et al., 2012). A l'âge adulte, les crises épileptiques semblent être moins fréquentes, en revanche les troubles cognitifs persistent (Jansen et al., 2006). En outre, on retrouve parfois des cas de mortalité inexpliqués appelés « mort subite inexpliquée en épilepsie » (MSIE) chez les patients épileptiques, et les enfants atteints du SD présentent un risque 15 fois supérieur de subir une MSIE (Kearney, 2013). Malgré la sévérité phénotypique du SD, cette épilepsie est pharmacorésistante (résistante aux traitements), il y a donc une véritable urgence

médicale afin de discerner les mécanismes impliqués dans la survenue de ce syndrome et de développer une nouvelle stratégie thérapeutique efficace.

L'excitabilité cérébrale générée dans ce syndrome peut être enregistrée à l'aide d'un EEG lors des crises épileptiques, mais également en dehors des crises (on parle d'activité « interictales ») pour certains patients (pour revue: Bureau and Bernardina, 2011).

Cette épilepsie est majoritairement due à des mutations *de novo* hétérozygotes du gène *SCN1A*, codant pour la sous-unité α du canal $\text{Na}_v1.1$ (Claes et al., 2001). Des centaines de mutations du gène *SCN1A* sont observées chez les patients atteints du SD pouvant correspondre à une mutation faux-sens, à une mutation non-sens qui engendrera une protéine tronquée, à une mutation du site d'épissage modifiant la séquence de l'ARN messenger (ARNm) mature, ou à une cassure chromosomique. Cependant, pour plus de 50% des patients, le SD est dû à une troncation du canal $\text{Na}_v1.1$ (Claes et al., 2001; Depienne et al., 2009). Mes travaux de thèse se sont donc focalisés sur une mutation tronquante du canal $\text{Na}_v1.1$ conduisant à la génération du phénotype observé chez les patients atteints du SD.

- **Diagnostic des épilepsies génétiques**

Entre l'âge de 6 mois et 5 ans, approximativement 5% des enfants manifestent des convulsions suite à une augmentation de fièvre. Ce n'est que si ces convulsions deviennent récurrentes qu'une épilepsie est suspectée (pour revue: Khair and Elmagrabi, 2015). Le diagnostic repose alors sur différents critères : puisqu'il est assez rare que le médecin puisse lui-même observer une crise, il se fie alors aux dires des parents et peut également s'intéresser aux antécédents familiaux et rechercher une mutation génétique (comme dans le cas de l'EGCF+ et du SD).

La recherche de perturbation de l'activité cérébrale paraît quelque fois fastidieuse, car pour la plupart des épilepsies génétiques, il n'y a pas d'anormalité évidente de l'EEG en dehors des périodes des crises.

L'EEG détecte des **oscillations** qui reflètent l'activité cérébrale : chaque neurone exerce un champ électromagnétique qui varie en fonction de la fréquence à laquelle il décharge des bouffées de PA. L'association des champs électromagnétiques de groupe de neurones génère des oscillations détectées par l'EEG. Ainsi les oscillations observées par EEG peuvent révéler à la fois la synchronisation d'un grand nombre de neurones qui déchargent à la même fréquence, mais aussi le décalage de phase entre la synchronisation de différents groupes de neurones, on parle alors de « *jitter* ».

L'analyse plus détaillée de l'activité cérébrale de patients épileptiques, réalisée grâce à des enregistrements EEG plus invasifs, a révélé des activités **oscillatoires à haute fréquence (OHF)** détectées en dehors des périodes de crises (périodes interictales) (pour revue: Jacobs et al., 2012). Ces activités OHF, enregistrées à des fréquences allant de 80 à 500Hz, ont pour la première fois été enregistrées chez des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal dans l'étude de Bragin et al., 1999. Cette étude a permis de distinguer des oscillations possédant un spectre de fréquence allant de 80 à 200Hz, associées aux décharges rythmiques et physiologiques des interneurons et des oscillations ayant un spectre allant de 200 à 500 Hz qui reflètent une

perturbation de la synchronisation des bouffées (ou *burst*) de décharge des neurones principaux au niveau de la zone cérébrale responsable de la génération des crises, appelée **zone épileptogène (ZE)**.

Lors des interventions chirurgicales chez des patients épileptiques, la résection de tissus contenant des OHF, et particulièrement ceux dans la gamme de fréquence allant de 200 à 500Hz, donne de bons résultats permettant l'arrêt complet des crises. Ainsi des chercheurs ont proposé que les OHF puissent être utilisés comme biomarqueurs de la ZE (pour revues: Jacobs et al., 2012; Jefferys et al., 2012; Zijlmans et al., 2012).

Dans l'hippocampe on retrouve des activités appelées « **sharp waves** » qui sont composées d'oscillations à différentes fréquences. Les OHF enregistrées entre 80 et 200Hz sont appelées « **ripples** » et des oscillations allant de 200 à 500 Hz sont appelées « **fast ripples** » (Buzsáki, 2015). La figure 12 montre un exemple de « **sharp-wave** » contenant des oscillations « **ripples** ».

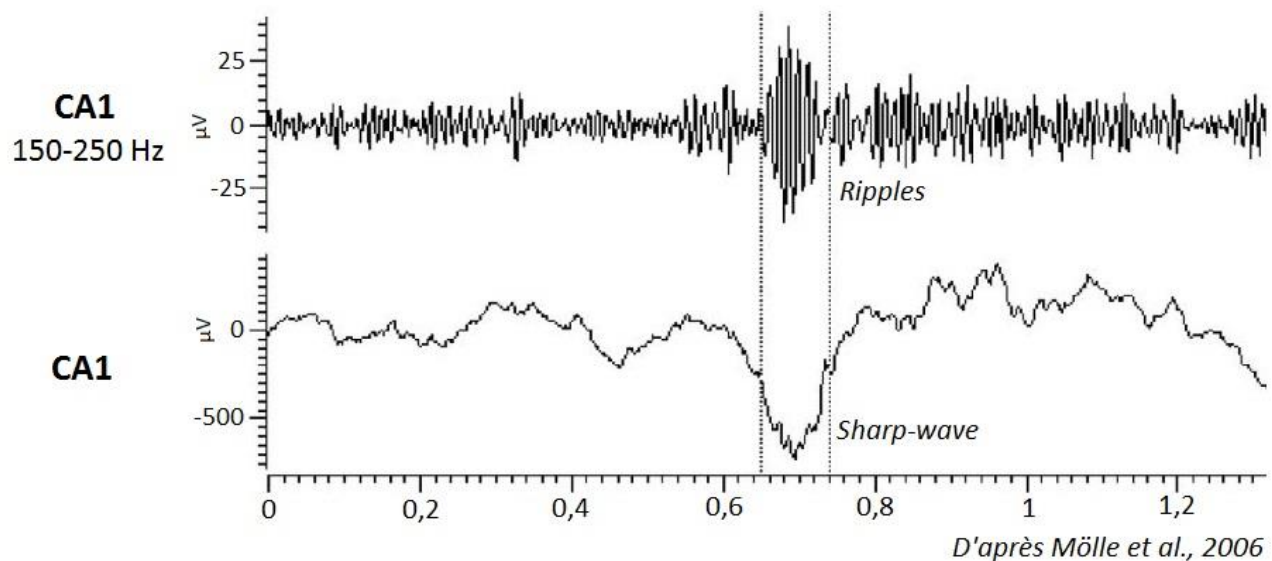


Fig. 12 : Enregistrement extracellulaire *in vivo* de l'hippocampe d'un rat pendant la phase de sommeil lent. On peut voir un « **sharp-wave** » composé d'oscillations détectables lorsque la trace est filtrée entre 150 et 250 Hz (**ripples**).

Les OHF supérieures à 200 Hz sont plus représentatifs d'activités pathologiques liées à l'épilepsie et pourraient donc être un outil intéressant pour faciliter le diagnostic des épilepsies génétiques et permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la génération des crises.

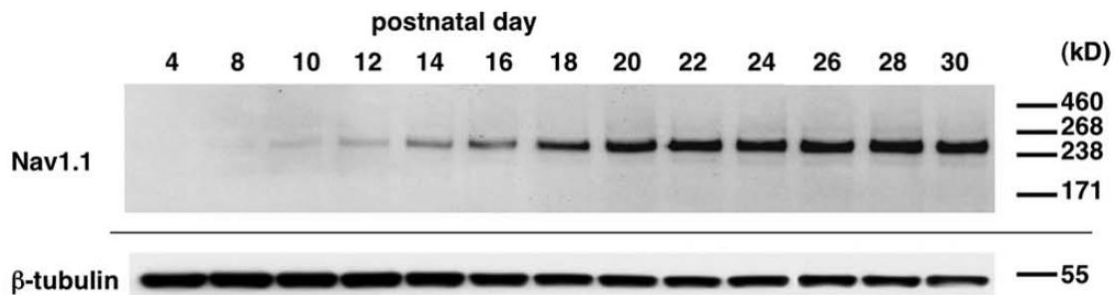
4. Recherche fondamentale :

Modèles animaux d'épilepsies liées aux mutations du canal $Na_v1.1$

- Modèles animaux

Afin d'étudier ces épilepsies génétiques, différents modèles animaux ont été générés afin de reproduire les mutations humaines du canal $Na_v1.1$ dans des modèles murins (Ito et al., 2013; Martin et al., 2010; Miller et al., 2014; Ogiwara et al., 2007; Tang et al., 2009; Yu et al., 2006), mais aussi dans des modèles de rat (Mashimo et al., 2010; Serikawa et al., 2015) et même chez le poisson zèbre (Baraban et al., 2013). En effet, le modèle animal choisi est très important et doit être adéquat au protocole utilisé pour étudier un type d'épilepsie particulier : par exemple les rats sont très utilisés avec des agents convulsivants et quelques modèles génétiques sont maintenant utilisés ; le poisson zèbre quant à lui est un modèle facile à utiliser et des manipulations génétiques sont maintenant réalisées pour obtenir des modèles d'épilepsies. Cependant un plus grand nombre de mutations sont déjà générées sur les modèles murins, qui reproduisent assez fidèlement les phénotypes humains observés dans la plupart des épilepsies génétiques.

Nous nous intéresserons donc plus particulièrement aux modèles murins pour étudier les mutations du canal $Na_v1.1$ des patients atteints de l'EGCF+ et du SD. Les études de ces épilepsies génétiques ont montré que les crises sont dues à un dysfonctionnement de l'excitabilité des interneurons GABAergiques, provoquant une réduction de l'inhibition cérébrale responsable d'une hyperexcitabilité au sein des réseaux neuronaux (Cheah et al., 2012; Ogiwara et al., 2007). En revanche le déséquilibre de l'excitabilité cérébrale n'est pas observé dès la naissance des souris, car le canal $Na_v1.1$ ne commence à être exprimé qu'à partir de 10 jours chez les souris sauvages et le pic d'expression est atteint à partir de 20 jours (Fig. 13) (Ogiwara et al., 2007).



Ogiwara et al., 2007

Fig. 13 : Expression de la protéine $Na_v1.1$ au cours du développement. Analyse westernblot de fractions membranaires de cerveaux de souris à différents âges, effectuée avec un anticorps polyclonal de lapin contre l'extrémité C-terminale du canal $Na_v1.1$, avec la β -tubuline utilisée comme contrôle.

Parmi les différents modèles murins d'épilepsies génétiques affectant le canal $Na_v1.1$ nous allons nous intéresser à un modèle de l'EGCF+ exprimant une mutation **Kock-in (KI)** du gène *Scn1a* (Martin et al., 2010) et à un modèle du SD exprimant une mutation **Knock-out (KO)** du gène *Scn1a* (Yu et al., 2006).

1) Modèle murin de l'Épilepsie Génétique avec Convulsions Fébriles Plus

Le modèle de l'EGCF+ généré par « [Martin et al., 2010](#) » exprime la mutation **R1648H** (R=Arginine et H=Histidine) qui est observée chez des patients atteints de l'EGCF+ de type 2. Cette mutation se situe sur le gène *Scn1a* et affecte le segment 4 du domaine IV du canal $\text{Na}_v1.1$ ([Fig. 14](#)).

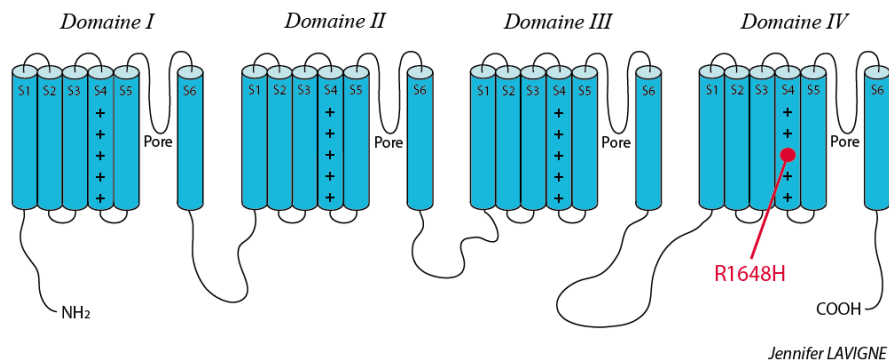
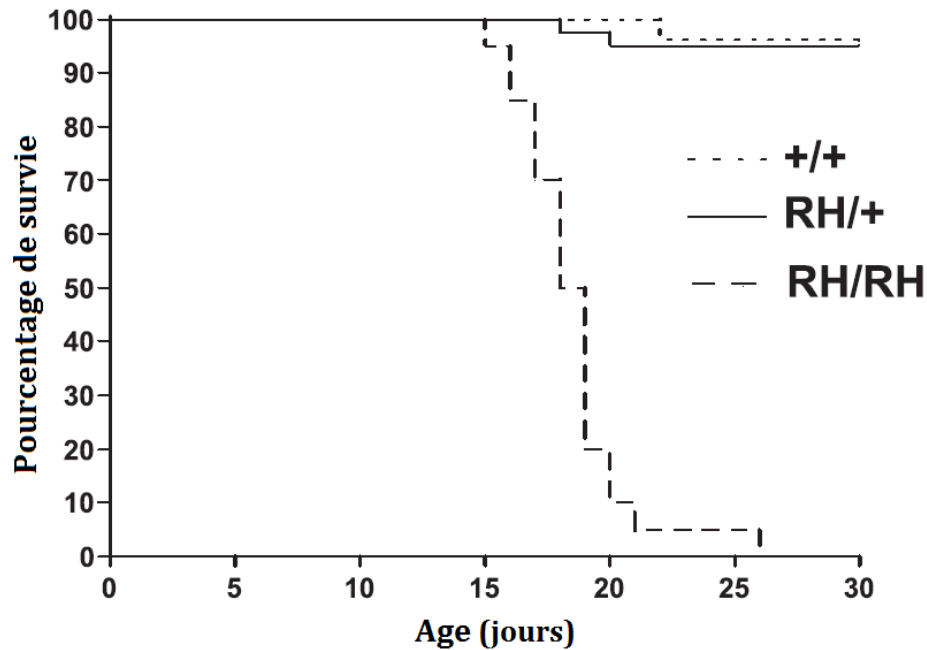


Fig. 14 : Mutation R1648H localisée sur le 4^{ème} segment du domaine IV
(inspiré de [Martin et al., 2010](#))

Les souris homozygotes pour la mutation R1648H, notées « $\text{Na}_v1.1^{\text{RH/RH}}$ », ont un phénotype similaire à celui des souris sauvages, notées « *wild type* » (WT) ou « $\text{Na}_v1.1^{+/+}$ », durant les 15 premiers jours de vie, puis elles commencent à développer des crises spontanées et à perdre du poids. C'est à partir de cet âge que le niveau d'expression des canaux $\text{Na}_v1.1$ commence à être conséquent ([Ogiwara et al., 2007](#)) ([Fig. 13](#)) et que la mutation commence à avoir un impact phénotypique. Leur espérance de vie est de 18.5 jours en moyenne ([Martin et al., 2010](#)) ([Fig. 15](#)). Cette létalité est certainement due à la sévérité des crises qui peuvent altérer le système nerveux autonome et conduire à un arrêt cardiaque ([Naritoku et al., 2003](#)). La sévérité du phénotype exprimé par les souris homozygotes est en accord avec le fait qu'aucun patient n'a été diagnostiqué avec deux allèles mutants pour le gène *SCN1A*.

Les souris hétérozygotes pour la mutation R1648H, notées « $\text{Na}_v1.1^{\text{RH}/+}$ », développent quant à elles un phénotype moins sévère, avec peu de crises spontanées ou de mortalité ([Fig. 15](#)). Par ailleurs, leur seuil de déclenchement de crises est réduit suite à une hyperthermie (mimant une forte fièvre chez les patients) ou suite à l'administration de flurothyle (un convulsivant chimique) comparé aux souris WT, mais d'autres agents convulsivants (tel que l'acide kaïnique) ne révèlent pas de différence comparé aux WT ([Martin et al., 2010](#)), suggérant que ces souris n'ont pas une sensibilité exacerbée à toutes les formes d'induction de crises. Le phénotype de ces souris est varié, tout comme celui des patients atteints d'EGCF+ portant cette mutation hétérozygote, avec lesquels elles partagent de nombreuses caractéristiques. Nous avons donc choisi d'utiliser ce modèle murin pour réaliser nos recherches.



Modifié d'après Martin et al., 2010

Fig. 15 : *Survie du modèle murin GEFS+. Représentation graphique du pourcentage de survie en fonction de l'âge (en jours) des souris sauvages (+/+) comparé aux souris porteuses de la mutation R1648H hétérozygote (RH/+) ou homozygote (RH/RH).*

L'étude de « [Martin et al., 2010](#) » a également révélé un impact fonctionnel dû à cette mutation, par des enregistrements électrophysiologiques réalisés sur des sous-populations de neurones en culture prélevés sur des souris âgées de 13 à 15 jours (P13-P15). Ces expériences ont montré que, bien qu'il n'y ait pas de variation du niveau d'expression du canal $Na_v1.1$ dans les neurones provenant des souris porteuses de la mutation $Na_v1.1^{RH/+}$, il y a cependant une diminution de la densité de courant sodique dans les neurones inhibiteurs, ainsi qu'une récupération plus lente après leur inactivation et une réduction de courant plus importante suite à des dépolarisations successives. Cependant aucune différence n'est observée pour les neurones excitateurs pyramidaux. Puisque la mutation R1648H altère préférentiellement les circuits neuronaux inhibiteurs, ces résultats sont donc en accord avec l'hypothèse selon laquelle les mutations du canal $Na_v1.1$ altèrent l'activité des interneurones, dont le dysfonctionnement pourrait expliquer l'incapacité à gérer l'excitabilité cérébrale générale et donc la survenue de crises épileptiques.

2) Modèle murin du Syndrome de Dravet

Pour la majorité des patients atteints du SD, on retrouve une mutation *de novo* du gène *SCN1A* qui produit un arrêt de la traduction protéique, conduisant à un canal $\text{Na}_v1.1$ tronqué au niveau C-terminal (Claes et al., 2001). Nous avons choisi de nous intéresser au modèle murin du SD généré par « Yu et al., 2006 » qui exprime une mutation Knock-out (KO) du gène *Scn1a*, produisant donc un canal $\text{Na}_v1.1$ non fonctionnel qui est tronqué au niveau du 3^{ème} segment du domaine IV (Fig.16).

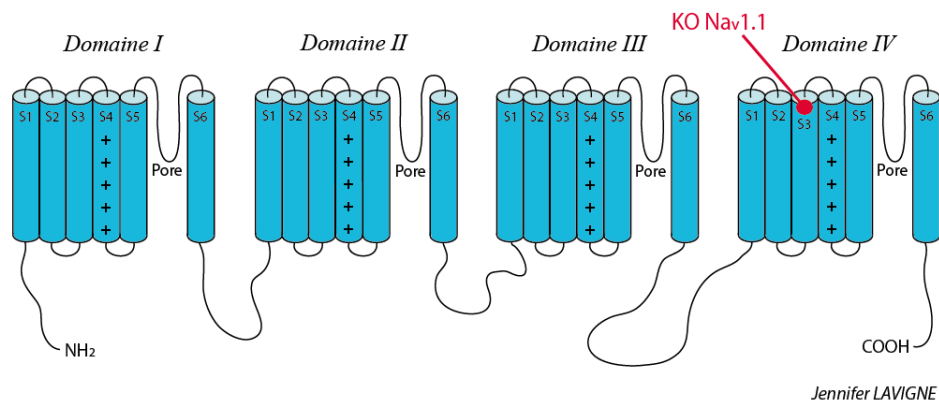


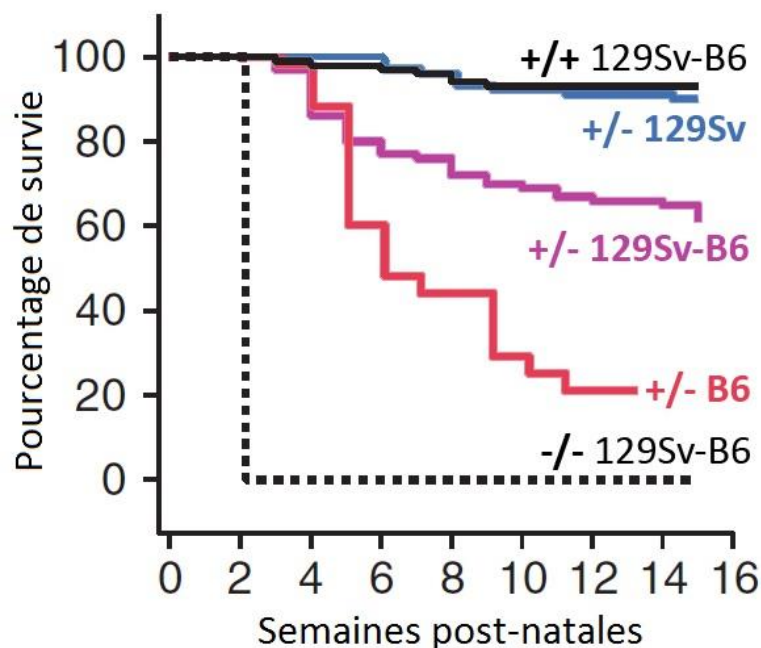
Fig. 16 : Mutation KO Nav.1.1 localisée sur le 3^{ème} segment du domaine IV
(inspiré de Yu et al., 2006)

L'incidence de cette mutation a été comparée dans l'étude de « Yu et al., 2006 » sur 3 différents fonds génétiques murins : des souris 129/SvJ (129Sv), des souris C57BL/6 (B6) et des souris hybrides 129/SvJ-C57BL/6 (129Sv-B6).

Les expériences d'électrophysiologie ont révélé que les souris exprimant la mutation KO du gène *Scn1a* présentaient une altération de la fonction des interneurons GABAergiques spécifiquement, se traduisant par la réduction du courant sodique et une diminution de leur excitabilité, sans altération des neurones excitateurs (Yu et al., 2006).

Les souris pour lesquelles les deux allèles du gène *Scn1a* ont été invalidés (mutation homozygote), notées « $\text{Na}_v1.1^{-/-}$ », ne présentent aucune expression des canaux $\text{Na}_v1.1$. Ces souris ont un phénotype similaire à celui des souris sauvages (WT) jusqu'au 9^{ème} jour quel que soit leur fond génétique, puis elles commencent à développer des ataxies et des crises spontanées. Elles ne survivent pas au-delà du 15^{ème} jour, ce qui révèle le rôle essentiel du canal $\text{Na}_v1.1$ pour la survie de ce modèle animal (Fig. 17).

Les souris hétérozygotes pour la mutation KO du gène *Scn1a*, notées « $\text{Na}_v1.1^{+/-}$ », ne possèdent la mutation que sur un seul allèle sans dominance négative, ce qui veut dire que la mutation sur un allèle n'altère pas l'expression ou les propriétés fonctionnelles des canaux fournis par l'autre allèle (Bechi et al., 2012). Elles expriment donc environ 50% des canaux $\text{Na}_v1.1$ sauvages à la membrane plasmique des neurones. Ces souris commencent à développer des crises spontanées entre le 21 et 27 jours (P21-27). Leur pourcentage de survie dépend du fond génétique, puisque l'incidence de la mortalité après l'apparition des premières crises est assez importante pour les souris C57BL/6 (80% à 12 semaines), comparé aux souris hybrides 129/SvJ-C57BL/6 (environ 35% à 12 semaines), alors qu'elle est proche de celle des souris sauvages pour les souris 129/SvJ (Yu et al., 2006) (Fig. 17). La fréquence des crises spontanées est proportionnelle au taux de mortalité pour chaque fond génétique.



Modifié d'après Yu et al., 2006

Fig. 17 : Représentation graphique du pourcentage de survie en fonction de l'âge des souris (en jours). Comparaison des souris sauvages de fond génétique hybride 129- C57BL/6 (+/+, noir) par rapport aux souris porteuses de la mutation KO $\text{Na}_v1.1$ homozygote (RH/RH) de fond génétique hybride 129-C57BL/6 (noir pointillé) et hétérozygote (+/-) de fond génétique 129 (bleu), C57BL/6 (rouge) ou hybride 129- C57BL/6 (rose).

Pour nos expériences, nous utilisons des modèles murins exprimant la mutation hétérozygote $\text{Na}_v1.1^{+/-}$ (semblable à la mutation observée chez les patients) possédant différents fonds génétiques en fonction des expériences réalisées.

Introduction du sujet de thèse

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé les modèles murins de l'EGCF+ et le SD cités ci-dessus afin de caractériser les périodes critiques étant impliquées dans le développement de ces épilepsies (épileptogénèse).

J'ai également étudié plus en détails les activités épileptiformes pendant les périodes pré-épileptiques et d'épilepsie chronique par des méthodes d'électrophysiologie.

Nous avons finalement mis au point une nouvelle stratégie utilisant une technique d'ARN interférents délivrés dans les neurones à l'aide de vecteurs viraux, afin de diminuer l'expression de certaines cibles d'intérêt impliquées dans la modulation de l'excitabilité neuronale. J'ai donc étudié l'effet de ce traitement sur les crises observées dans le modèle murin du SD.

1. Etude de la période pré-épileptique

Nous pensons qu'une meilleure compréhension de la période précédant l'apparition des premières crises, au cours de laquelle la diminution d'expression du canal $Na_v1.1$ est susceptible d'entraîner des réarrangements moléculaires, pourrait permettre un diagnostic précoce de ces épilepsies génétiques, afin d'agir plus rapidement et de manière plus adéquate lors de l'apparition des premières crises, voire d'empêcher l'apparition des crises si un traitement préventif peut être envisagé à l'avenir.

De plus, l'utilisation d'un traitement préventif sur des modèles murins empêchant l'apparition des crises permettrait de révéler si le développement des autres symptômes, tels que les troubles comportementaux ou les ataxies, sont dues à la succession des crises ou directement à la mutation.

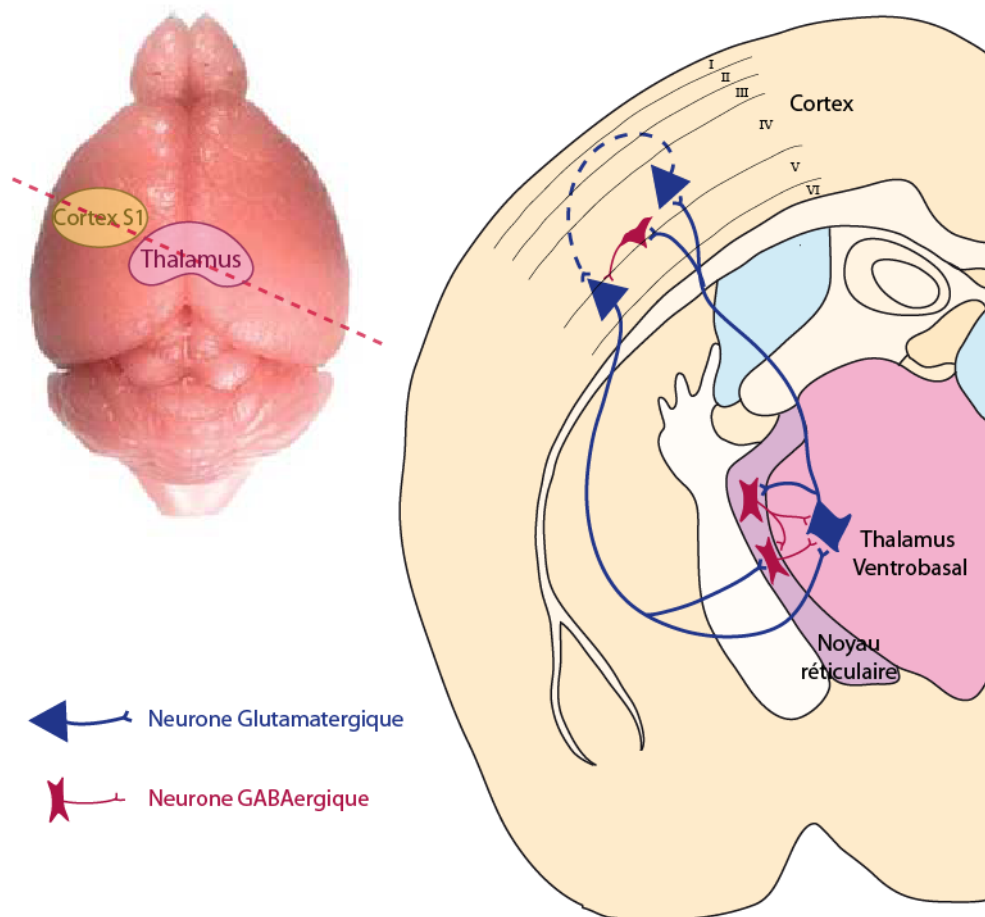
Afin d'étudier cette période, j'ai réalisé des expériences d'enregistrement en potentiel de champ (enregistrement extracellulaire de l'activité de groupe de neurones proches de l'électrode) sur des tranches de cerveau provenant des modèles murins d'EGCF+ et de SD entre l'âge de 15 et 20 jours (P15-20), ce qui correspond à un âge où le canal $Na_v1.1$ est déjà sensé être exprimé (Ogiwara et al., 2007) (Fig. 13, p.29) mais avant apparition de l'épilepsie.

- **Etude de la période pré-épileptique chez le modèle murin de l'EGCF+**

Parmi le large spectre de crises que peuvent développer les patients atteints d'EGCF+, on retrouve les crises d'absence ou « petit mal », qui sont des crises non-convulsives généralisées correspondant à une perte de conscience d'une dizaine de secondes sans perte de tonus musculaire, parfois difficilement détectable car l'enfant peut sembler tout simplement rêvasser. En effet, ces crises se caractérisent par un arrêt de l'activité et une insensibilité momentanée aux stimuli environnementaux, ainsi qu'un EEG révélant des décharges de type pointes-ondes (DPO). En 1968, Pierre Gloor soumit l'hypothèse que ces DPO pouvaient trouver leur

origine dans les mécanismes qui régissent le sommeil lent, sous le contrôle de la boucle Thalamo-Corticale (TC) (Gloor, 1968). Ainsi, lors d'une crise d'absence, la boucle TC imposerait un fort ralentissement des oscillations à environ 3 Hz (semblable à la fréquence des ondes observée lors du sommeil lent), provoquant une altération de l'état de conscience (Kostopoulos, 2001).

Sur le modèle murin de l'EGCF+, nous avons donc choisi de nous intéresser au réseau thalamo-cortical (TC) en période pré-épileptique. Des expériences ont été réalisées sur tranches de cerveaux préservant les connexions thalamo-corticales (TC), prélevées sur des souris avant apparition de l'épilepsie (P15-20). Ainsi ces tranches permettent de préserver les connexions entre le thalamus ventrobasal (VB), le noyau réticulaire (nRT), et le cortex somatosensoriel (S1) (Fig. 18).



Jennifer LAVIGNE

Fig. 18 : Schéma d'une coupe thalamo-corticale (TC). Les connexions entre le thalamus ventrobasal (qui contient principalement des neurones excitateurs), le noyau réticulaire (qui contient des neurones inhibiteurs) et le cortex somatosensoriel, qui contient à la fois des neurones excitateurs et inhibiteurs, sont préservées.

J'ai ainsi participé à l'élaboration d'un article scientifique, au sein duquel d'autres membres du laboratoire et des collaborateurs ont mis en évidence une perturbation des réseaux neuronaux inhibiteurs (Hedrich et al., 2014). En effet, la mutation $Na_v1.1^{RH/+}$ entraîne une diminution spécifique du taux de décharge des interneurons, entraînant un défaut d'inhibition sur le contrôle de l'excitabilité cérébrale.

Je me suis intéressée à l'impact de l'altération des interneurons, due à cette mutation, sur le réseau neuronal de la boucle TC en étudiant l'activité du réseau via des enregistrements extracellulaires en potentiel de champ.

• Etude de la période pré-épileptique chez le modèle murin du SD

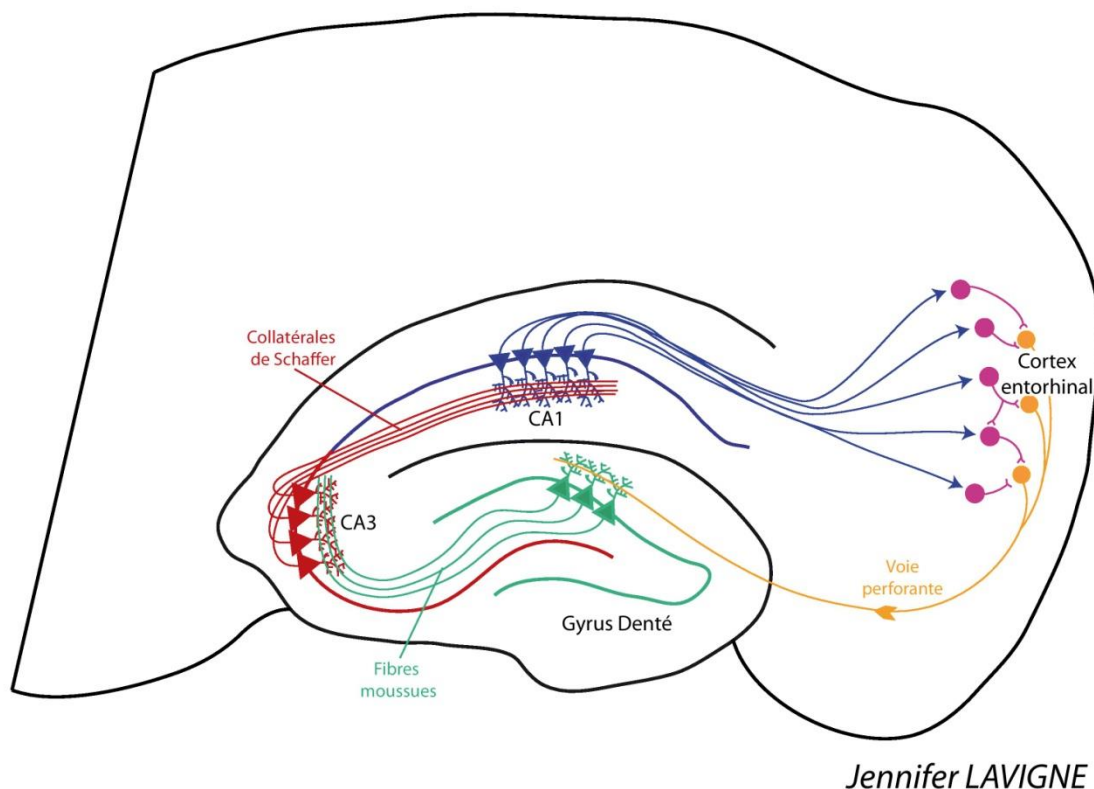
Pour l'étude du SD, nous avons choisi de nous focaliser sur le réseau hippocampique, car plusieurs études utilisant des modèles murins du SD se sont intéressées au réseau de l'hippocampe et ont montré que la délétion du canal sodique $Na_v1.1$ provoquait spécifiquement une réduction des courants sodiques dans les interneurons (Yu et al., 2006; Cheah et al., 2012). Cependant d'autres études ont également mis en évidence une altération de l'excitabilité des interneurons due à la mutation hétérozygote tronquante du canal $Nav1.1$ ($Nav1.1^{+/-}$) au niveau du réseau cortical en période pré-épileptique (Ogiwara et al., 2007), suggérant que le cortex puisse également être impliqué dans la génération des crises.

Une récente publication de notre laboratoire réalisée sur le réseau Hippocampo-Cortical a révélé une hyperexcitabilité de l'hippocampe chez les souris porteuses de la mutation $Nav1.1^{+/-}$ (Liautard et al., 2013). En effet, des enregistrements en potentiel de champ sur des tranches dont les connexions entre l'hippocampe et le cortex entorhinal ont été préservées, prélevées en période d'épilepsie chronique (P30-36), mais également en période pré-épileptique (P14-18), ont révélé des signes d'hyperexcitabilité dans l'hippocampe. Des expériences d'induction de crises par hyperthermie en période d'épilepsie chronique (P60-75) sur le même modèle murin, ont également montré que l'activité précédant l'activité ictale (activité pré-ictale) était détectée dans l'hippocampe avant le cortex. Ces résultats m'ont donc poussé à poursuivre mes expériences sur l'étude de ce réseau dans le modèle murin du SD. De plus, l'hippocampe est la structure la plus étudiée dans la recherche sur l'épilepsie, car de nombreuses épilepsies sont attribuées à des dysfonctionnements dans cette structure, tout particulièrement l'épilepsie du lobe temporal qui est la forme d'épilepsie la plus fréquente.

L'hippocampe et le cortex entorhinal (CE) forment une boucle via différentes régions interconnectées (Fig. 19) : le gyrus denté et la corne d'Ammon (CA), qui est subdivisée en 3 aires (CA1, CA2 et CA3). Dans l'hippocampe, les informations arrivent du CE aux cellules granuleuses du gyrus denté par la « voie perforante », puis celles-ci projettent leurs axones, appelés « fibres moussues », aux cellules pyramidales de l'aire CA3. Ces dernières font une troisième connexion au travers de leurs axones, appelés « collatérales de Schaffer », avec les cellules pyramidales de la zone CA1. Ce circuit correspond à la boucle trisynaptique de l'hippocampe. Les projections des cellules pyramidales de l'aire CA1 s'orientent ensuite vers le CE, où des neurones corticaux font des connexions entre eux avant que de renvoyer leurs projections vers l'hippocampe.

Contrairement au cortex qui possède 6 couches cellulaires, l'hippocampe n'en possède que 5 : le *stratum lacunosum/moleculare* est la couche la plus distale de l'arbre dendritique, le *stratum radiatum* contient à la fois les dendrites des neurones pyramidaux et les axones afférents, le *stratum pyramidale* contient les corps cellulaires des cellules pyramidales de la corne d'Ammon, le *stratum oriens* contient les dendrites basales des neurones pyramidaux CA1 et l'*alveus* contient leurs axones.

Pour l'étude de la période pré-épileptique sur le modèle de SD, j'ai poursuivi la caractérisation de l'hyperexcitabilité observée sur les tranches Hippocampo-Corticales de jeunes souris (P15-19) (Liautard et al., 2013).



Jennifer LAVIGNE

Fig. 19 : Schéma d'une coupe Hippocampo-Corticale.

Les fibres de la voie perforante venant du cortex entorhinal (CE) projettent leurs connexions au niveau des cellules pyramidales du gyrus denté de l'hippocampe, qui projettent elle mêmes sur les cellules pyramidales de la zone CA3. Ces dernières projettent sur les cellules pyramidales de la zone CA3, qui envoient leurs projections au niveau du CE. De là des neurones corticaux font des connexions entre eux avant de renvoyer des projections vers le gyrus denté.

Une récente étude réalisée *in vivo* sur le même modèle murin que nous utilisons en période pré-épileptique a révélé, grâce à des enregistrements en potentiel de champ, des activités spontanées au niveau du réseau cortical chez des souris porteuses d'une mutation tronquante du canal $\text{Na}_v1.1$ et leurs contrôles WT (Stasi et al., 2016). Cependant, aucune différence significative n'a été détectée entre les activités des deux groupes de souris, suggérant que l'altération de l'excitabilité des neurones inhibiteurs dans le cortex (Ogiwara et al., 2007) pourrait ne pas affecter l'excitabilité du réseau cortical en période pré-épileptique.

Puisque nous avons vu une forme d'hyperexcitabilité dans l'hippocampe comparé au cortex dans les tranches et que l'étude menée par « Liautard et al., 2013 » a montré que l'hippocampe était impacté avant le cortex lors de l'induction de crises, je me suis donc intéressée à l'activité cérébrale *in vivo* du modèle murin du SD durant la période pré-épileptique (P16-19), en me focalisant sur l'activité hippocampique et corticale.

2. Etude de l'épilepsie chronique sur le modèle de SD

Le SD étant une épilepsie très sévère, pour laquelle aucun traitement n'a montré d'efficacité avérée, j'ai choisi de me concentrer d'avantage sur l'étude de son modèle murin présentant la mutation $\text{Na}_v1.1^{+/-}$ pour étudier la période chronique et le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique.

Le canal $\text{Na}_v1.1$ ne commence à être exprimé dans les neurones des modèles murins qu'à partir de dix jours et son expression augmente au cours de la deuxième et troisième semaine (Ogiwara et al., 2007), période à partir de laquelle les crises commencent à apparaître pour les souris $\text{Na}_v1.1^{+/-}$. Dans ce modèle murin, on peut donc supposer que la réduction d'expression de ces canaux commence à entraîner une perte d'inhibition au cours du développement, entraînant progressivement l'apparition d'hyperexcitabilité du réseau cérébral jusqu'au déclenchement des crises qui deviendront ensuite récurrentes. On parle alors d'épilepsie chronique. L'étude de l'hyperexcitabilité cérébrale en période d'épilepsie chronique est essentielle pour pouvoir envisager de nouvelles cibles thérapeutiques et développer de nouveaux traitements.

Afin d'étudier le réseau reliant l'hippocampe au cortex entorhinal sur des souris en période d'épilepsie chronique (âgées de 30 à 36 jours), j'ai effectué des enregistrements en potentiel de champ au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe et au niveau du CE dans des tranches horizontales de cerveau. Les tranches ont été soumises à différentes conditions permettant de générer une hyperexcitabilité du réseau à l'aide d'agents pharmacologiques ou de stimulations électriques afin d'observer les différences entre les tranches provenant des souris porteuses de la mutation $\text{Nav}1.1^{+/-}$ et les contrôles WT. Nous cherchions à déceler les conditions capables d'induire des activités épileptiformes spécifiques du modèle murin du SD.

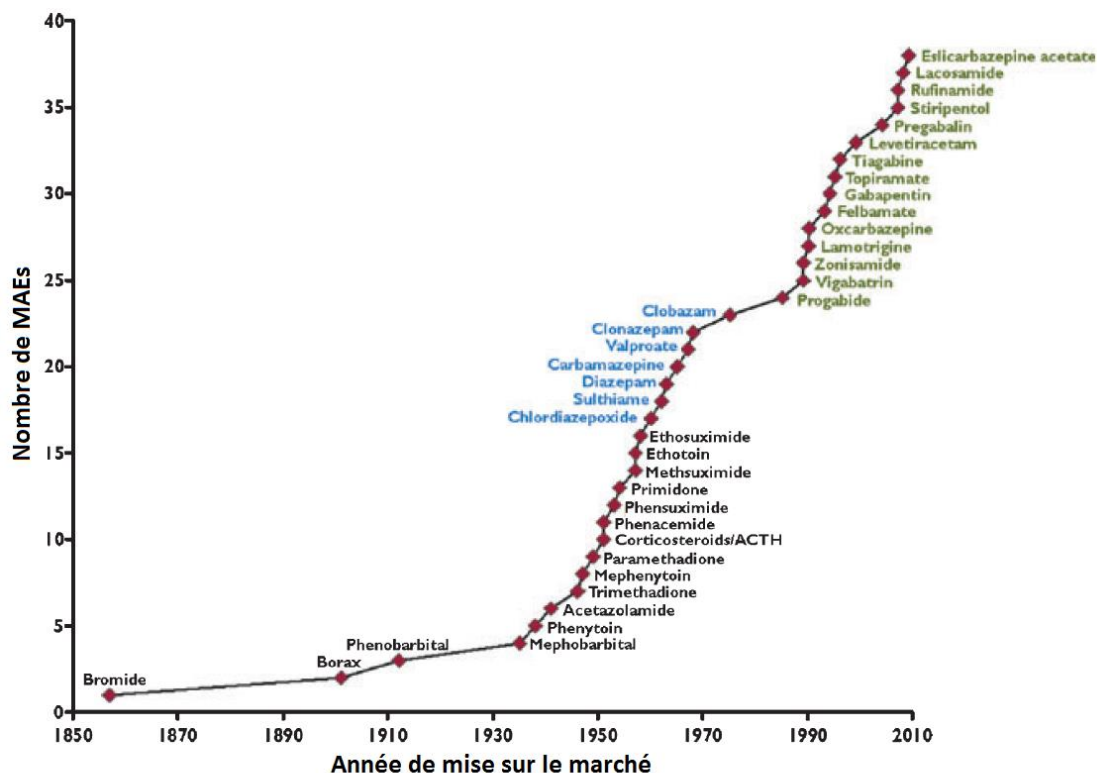
La carbamazépine (CBZ) est un antiépileptique, agissant en stabilisant l'état inactif des canaux sodiques voltages-dépendants, réduisant ainsi l'excitabilité de tous les sous-types neuronaux. Cependant, elle entraîne une aggravation des symptômes chez les patients atteints du SD (Guerrini et al., 1998). Nous avons donc choisi d'étudier l'effet de la CBZ sur les modèles d'inductions d'hyperexcitabilité ayant montré une pertinence pour le modèle murin du SD afin de vérifier la validité du modèle sur tranche par rapport à la

véritable pathologie. Cependant, nous verrons que cet agent pharmacologique n'induit pas l'effet escompté, révélant la complexité des mécanismes impliqués dans les réarrangements des réseaux neuronaux engendrés par la mutation $Na_v1.1^{+/-}$.

Le manque de fiabilité des modèles d'hyperexcitabilité sur tranches de cerveau provenant des souris porteuses de la mutation et des contrôles pour étudier les effets de traitements, nous ont poussé à tester l'effet d'une nouvelle stratégie « thérapeutique » directement sur le modèle murin *in vivo*.

3. Nouvelle stratégie visant à réduire l'excitabilité cérébrale

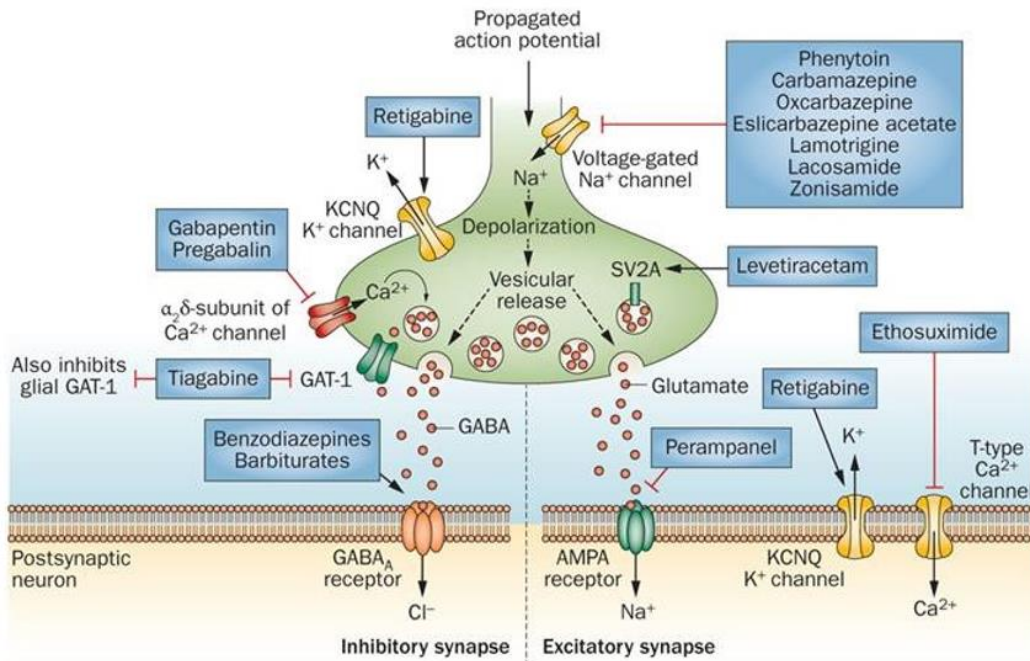
Le premier **médicament antiépileptique (MAE)** fut développé en 1857. Depuis, plus de 40 MAE ont été mis sur le marché (Löscher and Schmidt, 2011) (Fig. 20) sans qu'aucun n'ait montré de véritable efficacité sur les crises observées dans le SD.



Modifié d'après Löscher & Schmidt, 2011

Fig. 20 : Evolution de la mise sur le marché des médicaments antiépileptiques (MAE) de 1853 à 2009. Les médicaments de première génération sont notés en noir, ceux de seconde génération sont en bleu et la troisième génération de médicaments est notée en vert.

Ces MAE agissent sur différentes cibles moléculaires dans le but de diminuer l'excitabilité cérébrale (Fig. 21). La majorité agit en diminuant l'activité des canaux Na_v (ex : Phénytoïne, Carbamazépine), mais certains agissent sur d'autres canaux en diminuant l'activité des canaux calciques par exemple ou en augmentant l'activité des canaux potassiques. D'autres MAE agissent en potentialisant l'activité des récepteurs au GABA (ex : benzodiazépines) ou en inhibant la recapture de GABA à la synapse (ex : Tiagabine), ou encore en combinant plusieurs de ces mécanismes d'actions (ex : Valproate) (pour revue: Löscher and Schmidt, 2012; Mantegazza et al., 2010).



Löscher & Schmidt, 2012

Fig. 21 : Schéma représentatif des mécanismes d'action de certains MAE. Exemple d'une synapse inhibitrice (gauche) et excitatrice (droite). Certains MAE agissent comme agonistes soit des canaux potassiques ou des récepteurs du GABA laissant entrer le chlore dans la cellule. D'autres MAE agissent comme des antagonistes de canaux sodiques ou calciques, ou des transporteurs de recapture du GABA.

Cependant, bien que ces MAE aient différentes cibles moléculaires, ils n'ont pas la capacité de cibler différents sous types neuronaux dans différentes structures cérébrales. Par exemple, la Carbamazépine agit sur tout le système nerveux, en diminuant l'activité des canaux Na_v à la fois dans les neurones excitateurs et inhibiteurs.

Dans le modèle du SD, le déséquilibre cérébral semble venir du fait que l'activité des interneurones est réduite. Nous supposons donc que pour diminuer l'excitabilité cérébrale de manière plus efficace, il serait intéressant de diminuer uniquement l'activité des neurones excitateurs, afin de restaurer l'équilibre cérébral. Dans ce but, nous avons choisi de développer une nouvelle stratégie de thérapie génique en utilisant l'**interférence ARN** pour aller réduire l'expression des canaux Na_v spécifiquement dans les neurones excitateurs grâce à un promoteur spécifique. Ces constructions sont incorporées à des vecteurs viraux capables d'infecter les neurones pour y introduire leur contenu.

- **Thérapie génique utilisant l'interférence par ARN**

De manière courante le terme de thérapie génique est assimilé à une technique basée sur le transfert de gènes dans le noyau, cependant, il peut également s'apparenter à l'administration d'ARN interférents (ARNi) en dehors du noyau. Cette technique permet de réduire le taux d'expression des ARN messagers (ARNm) cibles, sans modifier le génome de la cellule hôte (pour revue: Kim and Rossi, 2007).

Il existe plusieurs types d'ARNi (Fig. 22) :

- Petits ARN interférents (pARNi) (Fig. 22.1): ces petits ARN double-brins, allant de 21 à 24 nucléotides (nt), sont synthétisés et introduits dans les cellules. Un complexe protéique (RISC) permet de cliver ces pARNi en simple brins, qui peuvent ensuite se fixer aux ARNm par complémentarité, empêchant leur traduction en protéine et entraînant leur clivage et leur dégradation.
Cette méthode de diminution d'expression d'ARNm n'est que transitoire, car les pARNi ne sont pas exprimés de manière continue dans la cellule.
- Micro-ARN (miARN) (Fig. 22.3) : ce sont de petits ARN simple brins (21 nt) naturellement présents dans les cellules, qui servent de régulateurs post-transcriptionnels en éteignant l'expression de certains gènes. Une ARN polymérase de type II (Pol II) permet leur transcription sous forme de longs précurseurs appelés « pri-miARN », possédant une tête en forme d'épingle à cheveux. Les extrémités de ces « pri-miARN » sont ensuite clivées par un complexe enzymatique (DROSHA) pour former des précurseurs intermédiaires appelés « pre-miARN » qui seront transportés du noyau vers le cytoplasme. C'est là qu'un autre complexe enzymatique (DICER) va permettre de couper la tête d'épingle du précurseur et de séparer les deux brins d'ARN afin de libérer le miARN qui ira alors interférer avec des ARNm par complémentarité.
- « small hairpin » ARN (shARN) (Fig. 22.2) : ces petits ARNs double brins synthétisés (29 nt) forment une boucle en forme d'épingle à cheveux (d'où le nom de « hairpin ») et ressemblent aux précurseurs intermédiaire des miARN naturellement présents dans les cellules. L'ADN codant pour ces shARN peut être introduit dans un plasmide qui sera lui-même intégré à un vecteur viral. Ainsi, une fois que le vecteur pénètre à l'intérieur des cellules, l'ADN plasmidique est transcrit en shARN grâce à une ARN polymérase de type III (Pol III). Le plasmide peut alors produire des shARN de manière continue dans la cellule, rendant cette méthode d'interférence à ARN stable.

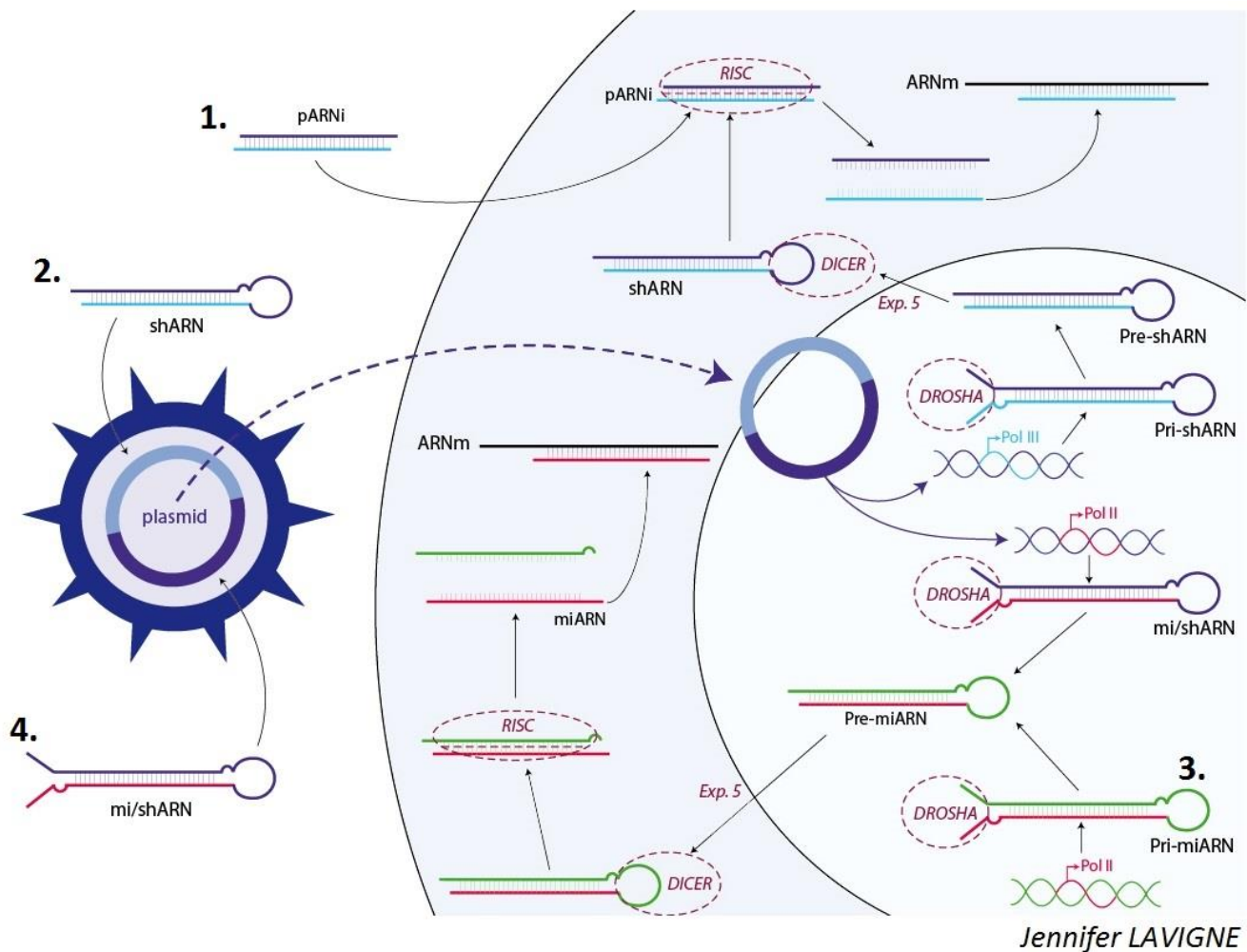


Fig. 22 : Voie d'expression des différents types d'ARNi.

1) Les petits ARNi (pARNi) sont synthétisés et introduits directement dans les cellules. 2) Les « small hairpin » ARN (shARN) sont synthétisés, introduits dans un vecteur qui permettra leur expression dans les cellules. 3) Les micro-ARN (miARN) endogènes sont déjà présents dans les cellules pour assurer la régulation post-transcriptionnelle. 4) Les hybrides mi/shARN sont synthétisés, introduits dans un vecteur qui permettra leur expression dans les cellules selon la même voie que les miARN.

Nous avons choisi de développer un hybride mi/shARN (Fig. 22.4) pour infecter nos cellules neuronales. En effet, nous avons synthétisé la séquence d'un miARN en y introduisant une séquence d'intérêt (tel un shARN), permettant une expression spécifique dans des sous-types cellulaires. Ainsi nous avons synthétisé un plasmide contenant 2 mi/shARN possédant les séquences complémentaires des ARNm des canaux sodiques présents dans le cerveau. En amont de cette construction, nous avons inséré le promoteur de la protéine kinase Ca²⁺/Calmoduline dépendant (CamKIIa), car celui-ci est spécifique des neurones excitateurs, et nous avons incorporé une séquence de protéine fluorescente verte (eGFP) afin de pouvoir marquer les cellules infectées (Fig. 23).

Cet hybride nous permet donc de réduire l'expression d'une cible moléculaire (canaux Na_v) dans un type cellulaire (neurones excitateurs), avec une insertion plus physiologique (transcription par l'ARN polymérase de type II). De plus, les cellules infectées sont observables par fluorescence.

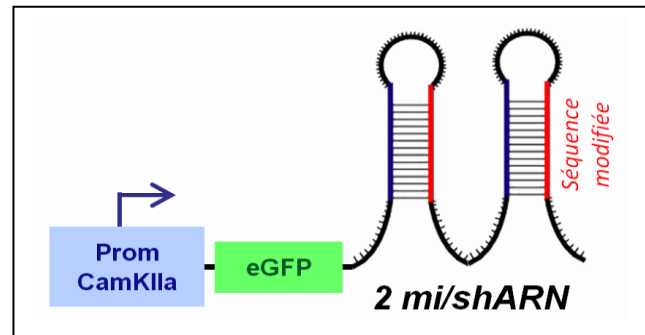


Fig. 23 : Construction contenant le promoteur CamKIIa, la protéine GFP et les 2 mi/shARN.

Avant d'introduire cette construction dans un vecteur viral, nous avons testé son efficacité *in vitro*, en la transfectant dans des cultures de cellules neuronales et en analysant l'effet sur les courants sodiques des cellules infectées grâce à des expériences de patch-clamp.

- **Vecteur viraux**

Afin d'introduire la construction à l'intérieur des neurones, nous utilisons de vecteurs viraux. Les virus ont naturellement la capacité, d'une part, d'infecter les cellules pour y transférer leur matériel génétique et d'autre part d'utiliser la machinerie cellulaire à leur avantage.

Nous avons initialement introduit les constructions contenant les ARNi dans un vecteur de type **lentivirus** (rétrovirus à ARN) qui sont utilisés dans de nombreuses études pour infecter les cellules (Parr-Brownlie et al., 2015). Cependant, nous avons finalement choisi d'utiliser un vecteur viral dérivé du **virus Adéno-associé (AAV)** qui possède une meilleure capacité de diffusion à travers les tissus et qui n'entraîne pas de réponse inflammatoire. L'AAV est un parvovirus non pathogène observé chez les primates, incapable de se répliquer par lui-même. Il nécessite la présence d'un virus auxiliaire (*helper virus*) afin d'utiliser ses enzymes pour répliquer son génome. Ce virus, composé d'un ADN simple-brin de 4,7 kb, est un vecteur de choix pour infecter un grand nombre de cellules, car étant de très petite taille (22nm) il a la capacité de bien diffuser à travers les tissus.

Les virus AAV utilisés sont modifiés afin de ne garder que les protéines de capsides, permettant leur adhésion cellulaire et l'internalisation de leur contenu. Ce sont donc de simples vecteurs, qui ne sont pas capables de se répliquer. Le génome est incorporé dans un plasmide qui restera dans le noyau sans s'incorporer à l'ADN de la cellule hôte.

Douze sérotypes différents d'AAV (AAV1 à AAV12) ont été identifiées à ce jour (Schmidt et al., 2008), dont 9 ont été classifiés en fonction de leur tropisme cellulaire dû aux différentes protéines qui composent leur capsid (Zincarelli et al., 2008).

Nous avons choisi d'utiliser un vecteur composé des protéines de capsid de l'AAV9, car il possède un fort tropisme pour les cellules neuronales et une bonne capacité de diffusion (Murlidharan et al., 2014).

Un plasmide contenant la séquence d'intérêt est utilisé pour générer le génome du vecteur viral. Ce plasmide est composé de 2 séquences répétées inversées (*ITR* : *inverted terminal repeat*) délimitant les séquences qui sont insérées dans la capsid de l'AAV : les séquences du promoteur CamKIIa, de la protéine fluorescente eGFP et de deux mi/shARN ciblant les ARNm des canaux sodiques (Fig. 24).

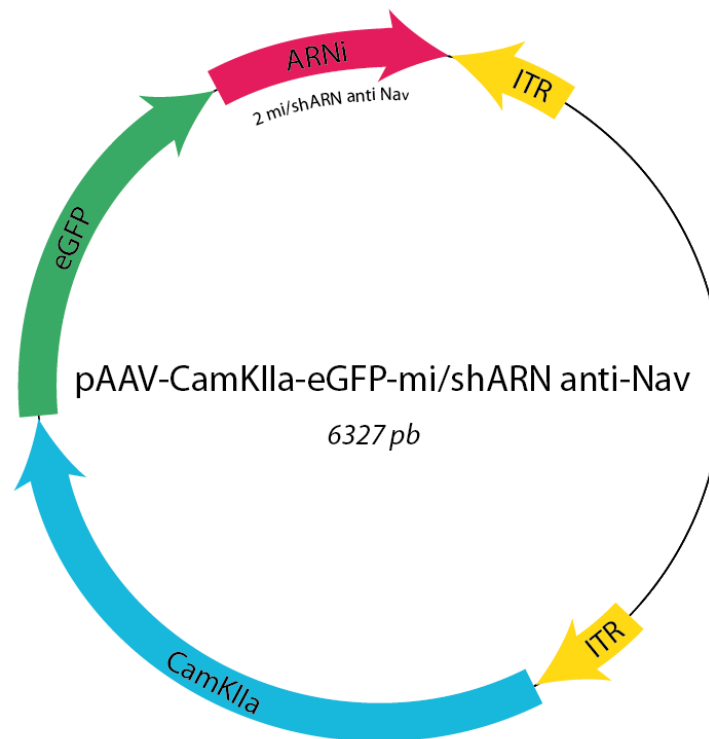
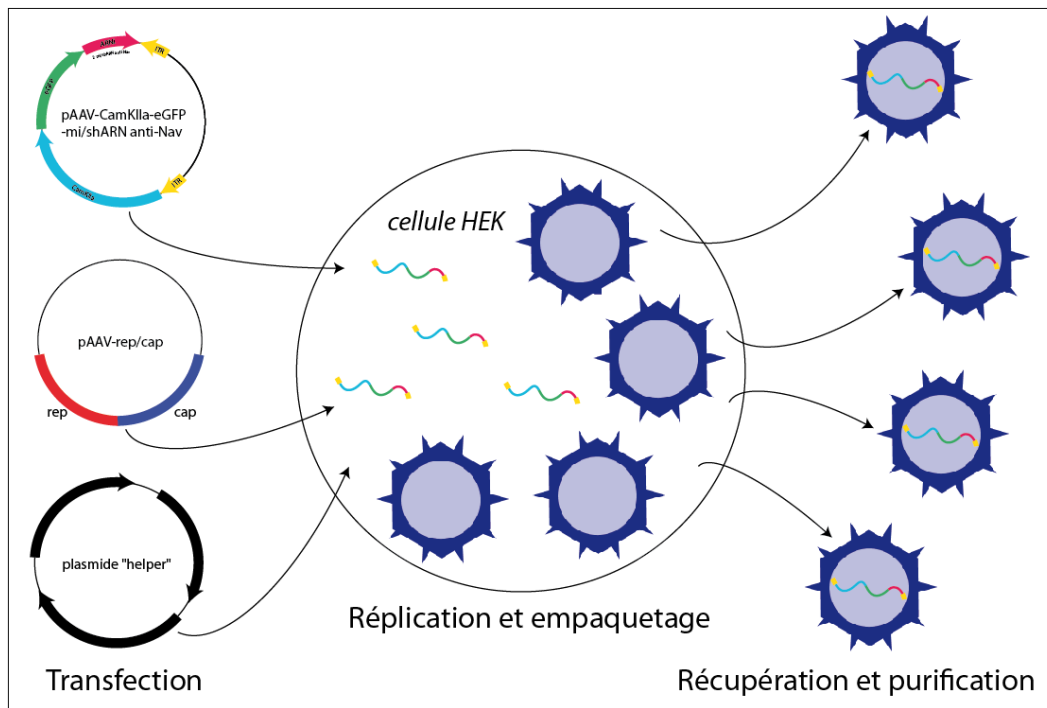


Fig. 24 : Vecteur plasmidique AAV. Les séquences « ITR » délimitent le promoteur CamKIIa, la séquence de la protéine eGFP et la séquence des deux mi/shARN ciblant les canaux Na_v .

Afin de produire ces vecteurs viraux, nous avons utilisé 3 plasmides (Fig. 25) :

- Le plasmide comportant la séquence d'intérêt flanquée des 2 séquences ITR.
- Un plasmide contenant les séquences des protéines « Rep » permettant la réplication, et des protéines « Cap » constituant les protéines de la capsid.
- Un plasmide « helper » apportant les protéines nécessaires à la traduction des séquences « Rep », activant ainsi la réplication du virus.

Ces 3 constructions sont transfectées dans des cellules provenant d'épithélium rénal embryonnaire (HEK : *Human Embryonic Kidney*), permettant la réplication de la séquence d'intérêt et son empaquetage dans la capsid. Une fois les vecteurs récupérés et purifiés, ils sont non répliquatifs puisque leur génome ne possède pas les protéines permettant leur division.



Jennifer LAVIGNE

Fig. 25 : Production des vecteurs viraux AAV contenant les constructions « CamKIIa-GFP-mi/shARN ». Introduction de 3 plasmides dans des cellules HEK permettant la synthèse du vecteur viral non répliatif : le plasmide contenant la séquence d'intérêt (pAAV-CamKIIa-eGFP-mi/shARN anti-Nav), un plasmide contenant les séquences permettant la synthèse des protéines de capsides et de réplication (pAAV-rep/cap) et un plasmide « helper » permettant la réplication du virus.

Nous avons ainsi produits des vecteurs possédant des ARNi ayant pour but de réduire l'expression des canaux Na_v dans les neurones excitateurs, appelés « **AAV-CamKIIa-eGFP-anti Na_v** » et leur contrôle appelé « **AAV-CamKIIa-eGFP-Ctrl** » s'exprimant également dans les neurones excitateurs, mais ne possédant qu'un seul mi/shARN contrôle n'ayant pas de cible car sa séquence est « brouillée ».

Ces vecteurs viraux ont été injectés au niveau de l'hippocampe des souris $\text{Na}_v1.1^{+/-}$ (modèle du SD), puis leur effets sur les crises épileptiques ont été analysés grâce à des enregistrements vidéos reliés à un **Electrocorticogramme (ECoG)**, qui permet d'enregistrer l'activité cérébrale grâce à des électrodes qui sont directement en contact avec la surface du cortex.

- **Effet des constructions virales sur le modèle murin du SD**

Différentes concentrations de virus et différents volumes d'injections ont été testés. Après avoir attendu un certain temps pour permettre l'expression des mi/shARN dans les neurones (environ 16 jours), les souris hétérozygotes $Na_v1.1^{+/-}$ furent observées à l'aide d'un système vidéo-ECOG permettant d'enregistrer leur activité cérébrale et d'observer leur comportement lors de crises. Ces enregistrements chroniques permettent d'étudier les crises spontanées.

Des crises par hyperthermie ont également été induites sur les mêmes souris, puisque le fait d'augmenter la température corporelle de la souris provoque une crise clonique, pareillement aux crises fébriles (ou hyperthermiques) observées chez les patients atteints du SD.

Les enregistrements chroniques ont été effectués avant et après l'induction de crises par hyperthermie afin de vérifier si elle provoque un effet sur les crises spontanées.



Mes travaux de thèse se divisent donc en 3 parties :

- L'étude des propriétés des réseaux neuronaux dans la période pré-épileptique sur 2 modèles murins d'épilepsies génétiques (GEFS+ et SD).
- L'étude du meilleur modèle d'hyperexcitabilité sur tranche de cerveau lors de la période d'épilepsie chronique (période de crises récurrentes) dans le modèle du Syndrome de Dravet.
- Le développement d'une nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité neuronale dans le Syndrome de Dravet.

Matériel & Méthodes

Animaux utilisés

Toutes les expériences sur les animaux vivants ont été réalisées avec l'accord du ministère de la recherche et du comité d'éthique en expérimentation animale, délivré par une autorisation de projet (référence ministérielle : 04551.02) et sont en conformité avec la législation européenne (directive 86/609/CEE du Conseil de l'Europe du 24 novembre 1986). De plus, les expériences ont été réalisées dans le respect de la règle des « 3 R », qui consiste à « réduire » le nombre d'animaux utilisés afin de limiter tout sacrifice inutile, à « raffiner » les techniques utilisées dans le but de limiter la souffrance et le stress, et à « remplacer » tant que possible l'utilisation des animaux lorsqu'un autre modèle peut être envisagé.

Les expériences ont toutes été réalisées à la fois sur des souris mâles et femelles car de précédentes expériences n'ont pas révélé de différences entre les deux sexes pour les épilepsies génétiques étudiés.

1. Modèle murin de l'Épilepsie Génétique avec Crises Fébriles Plus

Les études menées au cours de ma thèse sur l'EGCF+ en période pré-épileptique ont été réalisées sur des souris de fond génétique C57BL/6 porteuses de la mutation hétérozygote R1648H ($\text{Na}_v1.1^{\text{RH}/+}$) (Martin et al., 2010). Le maintien de la lignée est réalisé en accouplant une souris sauvage (WT) avec une souris porteuse de la mutation hétérozygote afin d'obtenir des portées composées uniquement de souris $\text{Na}_v1.1^{\text{RH}/+}$ et WT, ces dernières servant de contrôle pour les expériences. Pour quelques expériences énoncées dans le papier publié (Hedrich et al., 2014) mais qui n'ont pas été réalisées par moi-même, des accouplements entre 2 souris hétérozygotes $\text{Na}_v1.1^{\text{RH}/+}$ ont été réalisées afin d'obtenir des souris homozygotes pour la mutation R1648H ($\text{Na}_v1.1^{\text{RH}/\text{RH}}$).

- **Génotypage**

Afin de connaître le génotype des souris, une biopsie est réalisée sur les nouveau-nés âgés de 5 jours afin de récupérer leur ADN. Des amorces spécifiques de la séquence d'intérêt ont été choisies pour amplifier l'ADN et une enzyme permet de cliver uniquement la séquence mutée afin d'obtenir des brins de taille différente en fonction de la présence ou non de la mutation. Les séquences sont donc amplifiées à partir de ces amorces grâce à une réaction en chaîne par polymérase (PCR : *Polymerase Chain Reaction*) avant migration sur un gel d'électrophorèse qui permet de les séparer en fonction de leur taille. Un marqueur de poids/taille moléculaire est utilisé pour définir la taille des séquences détectées. La séquence de l'allèle WT mesure 591 paires de base (pb) alors que la séquence de l'allèle mutée mesure 461 pb. Pour une souris sauvage (homozygote) nous observerons une seule bande de 591 pb, alors que si elle possède la mutation hétérozygote nous en observerons deux de 591 et 461 pb (Fig. 26). Dans le cas d'une souris homozygote pour la mutation R1648H, nous n'observerons qu'une seule bande de 461 pb.

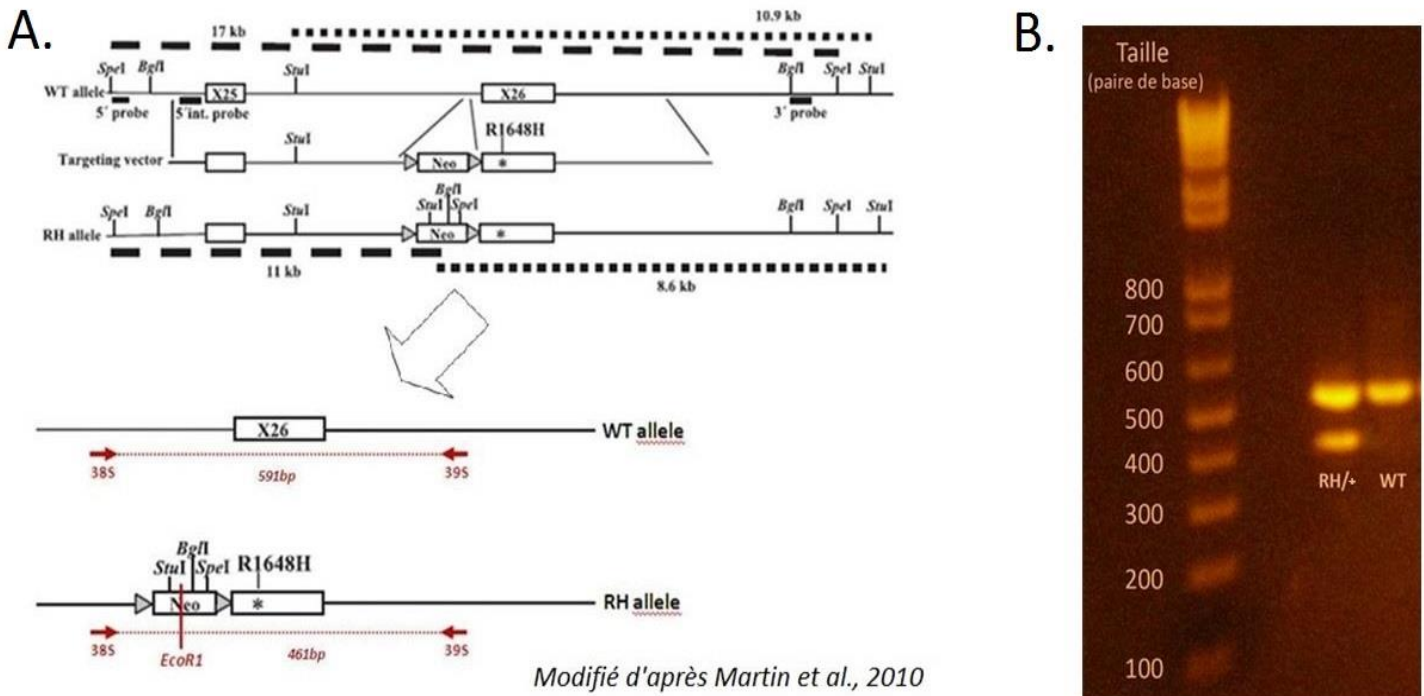


Fig. 26 : Génotypage des souris hétérozygotes $Na_v1.1^{RH/+}$ et des souris WT. A) Illustration des constructions utilisées par « Martin et al., 2010 » pour générer le modèle murin de l'EGCF+ (haut) et représentation de l'allèle WT et de l'allèle porteuse de la mutation R1648H avec les amorces permettant d'amplifier les séquences d'intérêt par PCR (385 et 395), ainsi que le site de restriction localisé uniquement sur le brin muté, permettant à l'enzyme EcoRI de le cliver (bas) ; B) Exemple d'un gel d'agarose après avoir été soumis à l'électrophorèse révélant les bandes du marqueur de poids moléculaire (gauche), deux bandes (reflétant 2 séquences de taille différente) pour une souris $Na_v1.1^{RH/+}$ et une bande pour une souris homozygote WT.

2. Modèle murin du Syndrome de Dravet

Pour l'étude du SD, les expériences ont été menées sur des souris porteuses de la mutation hétérozygote KO pour le gène *Scn1a*, codant pour le canal $Na_v1.1$ ($Na_v1.1^{+/-}$) (Yu et al., 2006), mais les fond génétiques utilisés variaient en fonction de l'étude menée (ils seront détaillés par la suite). Le maintien de la lignée est réalisé en accouplant une souris WT avec une souris porteuse de la mutation hétérozygote afin d'obtenir des portées composées uniquement de souris $Na_v1.1^{+/-}$ et WT, ces dernières servant de contrôle pour les expériences. Cela évite également la naissance de souris homozygotes $Na_v1.1^{-/-}$ qui ne sont pas représentatives de la pathologie humaine et meurent environ 15 jours après leur naissance.

• **Génotypage**

Comme pour l'autre modèle murin, une biopsie est réalisée sur les nouveau-nés âgés de 5 jours afin de récupérer leur ADN et de réaliser le génotypage. Des amorces spécifiques des séquences où se situe la mutation, ou spécifiques de la séquence sauvage ont été choisis afin d'amplifier l'ADN selon des tailles différentes. Les séquences sont amplifiées à partir de ces amorces grâce à une PCR, puis sont mise à migrer sur un gel d'électrophorèse afin de les séparer en fonction de leur taille. Ainsi, les amorces sélectionnées permettent de révéler la séquence de l'allèle WT à une taille de 291 pb alors que la séquence de l'allèle mutée mesure 150 pb. Comme pour le modèle EGCF+ nous observons une seule bande pour une souris WT (291 pb) et deux bandes pour une souris porteuse de la mutation (150 pb). Des problèmes de réactifs nous obligent à séparer les réactions pour les amorces détectant le brin WT et le brin muté, les bandes sont donc localisées au niveau de deux puits différences pour une même souris (Fig. 27).

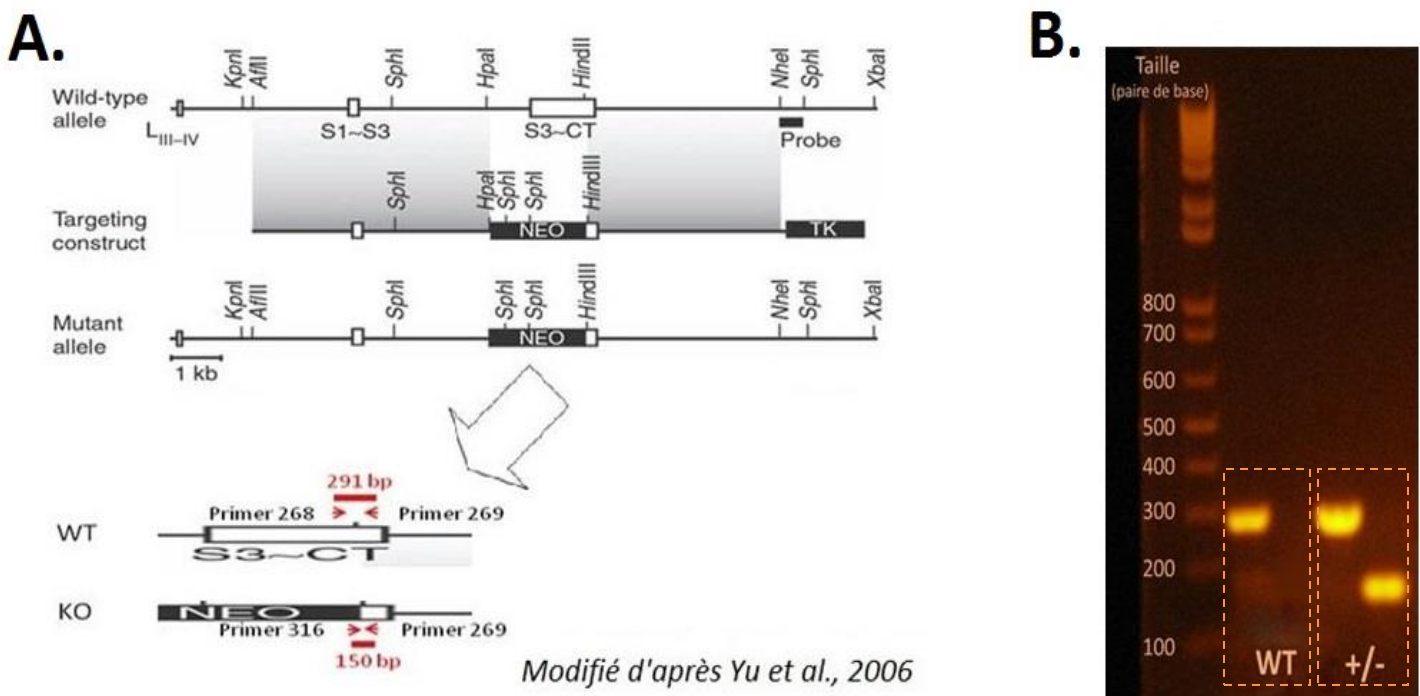


Fig. 27 : Génotypage des souris hétérozygotes *Nav1.1*^{+/-} et des souris WT. A) Illustration des constructions utilisées par « Yu et al., 2006 » pour générer le modèle murin du SD (haut) et représentation des sites de détection des amorces spécifiques de l'allèle WT (amorces 268 et 269) et porteuse de la mutation KO pour le gène *Scn1a* (amorces 316 et 269) (bas) ; B) Exemple d'un gel d'agarose après électrophorèse, révélant les bandes du marqueur de poids moléculaire (gauche), une bande (291 pb) reflétant une souris homozygote WT et deux bandes (291 et 150 pb dans 2 puits différents) pour une souris *Nav1.1*^{+/-}.

- **Etude de la période pré-épileptique et de l'épilepsie chronique**

L'étude de la période pré-épileptique et de l'épilepsie chronique fait suite aux travaux réalisés par « [Liautard et al., 2013](#) » sur la compréhension de l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD. Ainsi, nous avons utilisé les mêmes souris de fond génétique mixte C57BL/6 et CD1 possédant la mutation hétérozygote KO pour le gène *Scn1a* et les contrôles WT provenant des mêmes portées. Les souris possédant la mutation étaient initialement de fond génétique CD1, mais leur phénotype n'étant pas assez sévère, nous avons effectué des accouplements avec des souris de fond génétique C57BL/6 exprimant un phénotype plus sévère avec la même mutation ([Yu et al., 2006](#)). Ainsi les accouplements ont été réalisés selon une technique de rétrocroisement (backcross) en accouplant les souris porteuses de la mutation hétérozygote $Na_v1.1^{+/-}$ avec des souris WT de fond C57BL/6 sur des dizaines de générations. Aujourd'hui ces souris ont donc un fond majoritairement C57BL/6.

- **Etude de l'effet de la nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité**

Pour l'étude de la stratégie visant à réduire l'excitabilité cérébrale, nous voulions choisir un modèle murin du SD avec un fond génétique présentant un phénotype modéré afin de ne pas avoir trop de mortalité, mais permettant tout de même d'avoir un certain nombre de crises pour visualiser l'effet de la stratégie. Aussi nous avons choisi d'effectuer des accouplements entre des souris possédant un phénotype sévère (C57BL/6) et des souris possédant un phénotype très modéré (129) ([Yu et al., 2006](#)). Nous avons donc utilisé les descendants F1 50% C57BL/6-50% 129 pour réaliser ces expériences.



Expériences *in vitro*

1. Electrophysiologie sur tranches de cerveaux

- **Préparation et maintien des tranches de cerveau**

Les souris âgées de 14 à 20 jours ou de 30 à 35 jours, sont anesthésiées par voie aérienne sous isoflurane (*Iso-Vet 1000mg/g*) puis sacrifiées par décapitation. Le cerveau est alors rapidement prélevé puis immergé dans une solution de Liquide CérébroSpinal artificiel (LCSa) froide (4°C) saturée en carbogène (95% O₂ ; 5% CO₂). Le LCSa est composé de 124 mM de NaCl, 3.75 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂.6H₂O, 1.25 mM de NaH₂PO₄, 2 mM de MgSO₄, 26.5 mM de NaHCO₃ et 10 mM de glucose.

Le cerveau est ensuite collé sur un support à l'aide de colle cyanoacrylate et rapidement immergé dans la solution de LCSa froid, saturé en carbogène. Les tranches sont effectuées à l'épaisseur souhaitée avec un microtome (*Microm HM 650V, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*).

1) Tranches Thalamo-Corticales (TC)

Pour l'étude du modèle de l'EGCF+ en période pré-épileptique, des tranches thalamo-corticales sont réalisées en suivant le protocole décrit par « [Agmon and Connors, 1991](#) » qui permet d'effectuer des coupes préservant les connexions entre le complexe ventro-basal (VB), le noyau réticulaire (nRT) du thalamus et le cortex somatosensoriel, formant ainsi la boucle Thalamo-Corticale (TC) ([Fig. 28](#)). Les enregistrements en potentiel de champ se font avec des tranches de 600 µm, épaisseur suffisante pour préserver les connexions tout en permettant une bonne oxygénation et perfusion des cellules.

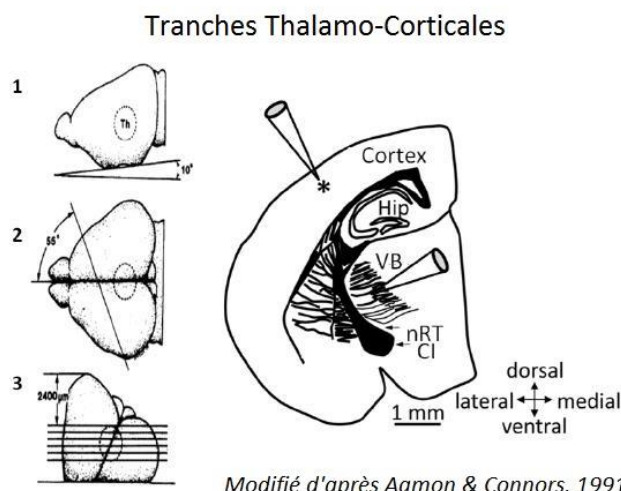


Fig. 28 : Réalisation des tranches Thalamo-Corticales (TC). 1) Le cerveau est posé (lobes frontaux vers le bas) sur un support incliné de 10 degrés par rapport au plan horizontal, 2) il est ensuite coupé verticalement avec un angle de 55 degrés par rapport à la scissure interhémisphérique, 3) la surface coupée est ensuite collée sur un support avant que les tranches ne soient effectuées au microtome en préservant les connexions entre les structures du thalamus et du cortex somatosensoriel (droite)
 VB : complexe ventro-basal du thalamus, nRT : noyau réticulaire du thalamus, CI : capsule interne, Hip : hippocampe

2) Tranches Hippocampo-Corticales

Pour l'étude sur le modèle murin du SD, que ce soit en période pré-épileptique ou lors de l'épilepsie chronique, des tranches horizontales ont été réalisées, permettant de maintenir les connexions entre l'hippocampe et le cortex entorhinal (Fig. 29). Les connexions étant plus facilement préservées dans ce réseau que dans le réseau TC, nous effectuons des tranches plus fines, de 400 μm , afin d'avoir une meilleure oxygénation et perfusion des cellules.

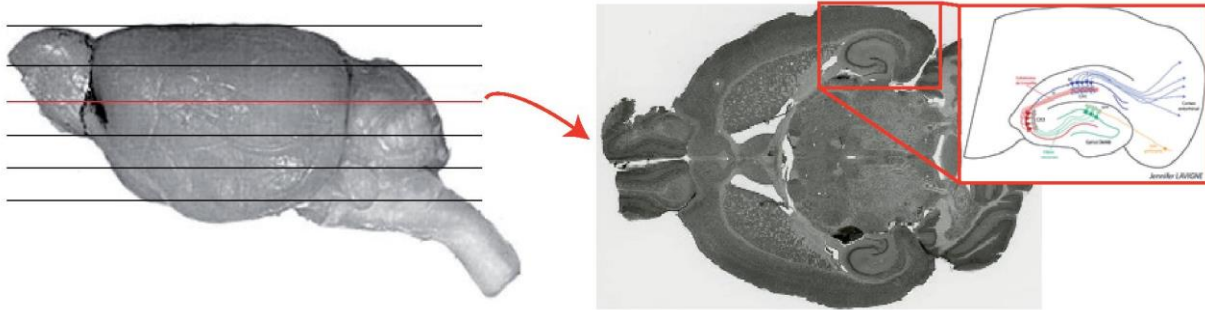


Fig. 29 : *Réalisation des tranches Hippocampo-Corticales.* Des tranches horizontales de 400 μm sont effectuées au vibratome (gauche), permettant de préserver les connexions des différentes structures de l'hippocampe et du cortex entorhinal (droite).

3) Maintien des tranches avant et pendant l'expérience

Tout de suite après avoir été coupées, les tranches sont placées dans une chambre à interface (*Dual channel Acrylic chamber system, Campden Instruments Ltd.*) et observées avec une loupe binoculaire avant d'être laissées au repos pendant au moins 1h. Les enregistrements sont effectués avec des électrodes d'enregistrements manipulées grâce à des micromanipulateurs (Fig. 30). Les tranches sont perfusées grâce à une pompe péristaltique (*Gilson*) à l'interface entre le LCSa oxygéné et l'atmosphère O_2/CO_2 saturée d'humidité. Le LCSa qui arrive aux tranches est chauffé à 34°C grâce à un contrôleur de température (*745 series P.I.D, Campden Instruments Ltd.*) et des agents pharmacologiques peuvent y être ajoutés selon les expériences réalisées.

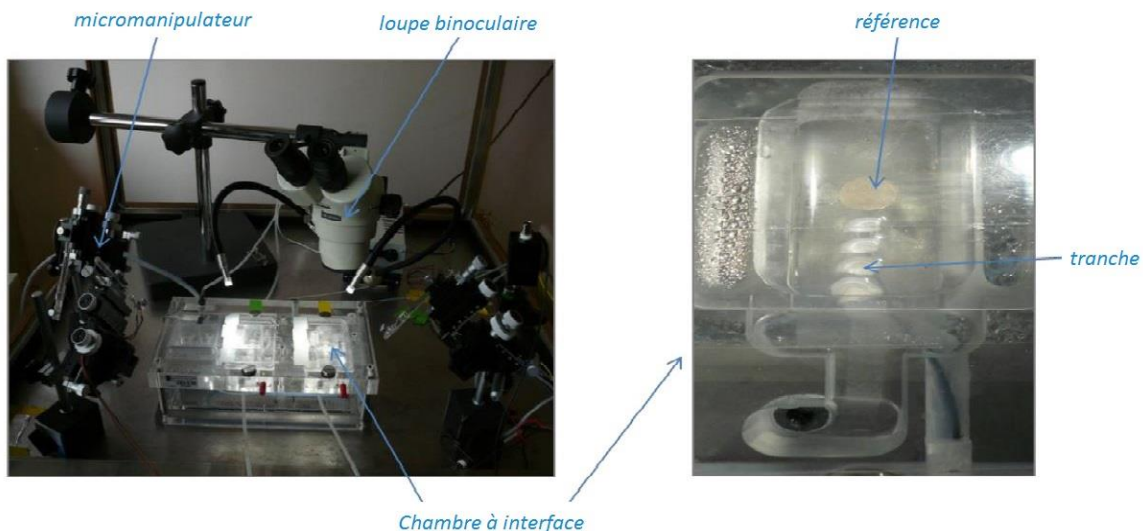


Fig. 30 : *Poste d'électrophysiologie.* Loupe binoculaire, micromanipulateurs et Chambre à interface (gauche) à l'intérieur de laquelle on peut voir les tranches de cerveau et l'électrode de référence (droite).

- **Enregistrement des tranches en potentiel de champ**

Les enregistrements de potentiels de champ sont réalisés à l'aide d'une électrode extracellulaire placée dans la zone d'intérêt de la tranche. Les potentiels enregistrés correspondent à la somme des réponses, spontanées ou induites, d'un ensemble de neurones à proximité de l'électrode d'enregistrement. Les variations de potentiels électriques permettent d'évaluer l'excitabilité de la zone enregistrée.

Les variations de potentiels au niveau de la tranche sont captées par des pipettes fabriquées à partir de capillaires de borosilicate (*diamètre externe : 1.5 mm, diamètre interne : 0.86 mm, Science Products*). Elles sont façonnées par une étireuse horizontale (*P-97, Sutter Instruments, USA*) de manière à obtenir une ouverture à la pointe de la pipette correspondant à une résistance de 4 à 8 M Ω . La pipette est ensuite remplie de solution saline (NaCl 0.9%) et l'électrode d'enregistrement, correspondant à un fil d'argent chloruré, est insérée dans la pipette. L'électrode de référence quant à elle, est intégrée à la chambre à interface, directement au contact du LCSa (*Fig. 30*). Ainsi la différence de potentiel sera mesurée entre l'électrode d'enregistrement et l'électrode de référence. Une lampe binoculaire permet de visualiser les tranches et de placer les électrodes dans les zones d'intérêt (*Fig. 30*).

Les signaux détectés par les électrodes d'enregistrement sont amplifiés par un amplificateur (*Ex4-4 Quad Differential amplifier, Dagan corporation*), convertis sous format numérique grâce à un système d'acquisition (*Digidata 1440A, Axon CNS Molecular Devices*) et enregistrés sur l'ordinateur avec le logiciel pClamp10.2 (*Axon Instruments, USA*).

1) Activités spontanées

Seules les activités d'une amplitude minimum de 0,1 mV ont été prises en compte pour l'analyse.

Pour la visualisation des oscillations haute fréquences (OHF), les activités spontanées ont été filtrées entre 40 et 200 Hz ou entre 200 et 600 Hz (*filtre 8 pôles Bessel-Bessel, pClamp*). Lors de l'analyse de l'aire des OHF, le bruit potentiel a été soustrait en enlevant l'aire absolue d'une période sans évènement à l'aire absolue d'une période (de même durée) contenant une OHF à l'aide du logiciel Origin 9.0. L'amplitude des activités spontanées non filtrées peut induire un biais sur l'aire des OHF, nous avons donc normalisé les aires absolues des OHF sans bruit en les divisant par les aires absolues des activités non filtrées correspondantes (logiciel Origin 9.0).

2) Stimulations électriques

Pour les tranches TC, une double stimulation électrique (*paired-pulse*) a été réalisée au niveau du thalamus VB et la réponse enregistrée en potentiel de champ au niveau du cortex somatosensoriel afin de vérifier que les connexions du réseau étaient bien préservées. La stimulation est effectuée à l'aide d'une électrode bipolaire et d'un isolateur (*Isolated current source SIU91A, Cygnus technology*) commandé par ordinateur avec le logiciel pClamp et le système d'acquisition Digidata. Le protocole de double stimulation électrique que nous avons utilisé correspond à l'application de deux stimuli séparés de 100 ms à une

fréquence de 0.02 Hz. Si une réponse est observée, des enregistrements d'activités spontanées ont ensuite été effectués sur ces tranches.

Pour les tranches Hippocampo-Corticales, nous avons évalué la réponse du réseau à différentes intensités de stimulations électriques en effectuant une courbe appelée « input-output ». Nous avons placé l'électrode de stimulation au niveau des collatérales de Schaffer et l'électrode d'enregistrement au niveau du stratum pyramidale de l'aire CA1 de l'hippocampe. La gamme de réponse a été effectuée de la même manière que précédemment et avec le même appareillage en appliquant des courants d'intensité croissante à une fréquence de 0.2 Hz et en mesurant l'amplitude des pics de réponse. L'intensité de courant générant la réponse d'amplitude maximale a été choisie pour appliquer ensuite le protocole de stimulation tétanique, qui correspond à l'application de 10 stimuli à 100 Hz.

3) Perfusion d'agents pharmacologiques

➤ Pour l'étude de la période pré-épileptique (P14-20) dans le modèle murin du SD, l'effet « thérapeutique » de la cholecystokinine (CCK), un peptide neuronal possédant un effet excitateur sur les interneurons PV, a été testé sur les tranches Hippocampo-Corticales :

- Cholecystokinine :

Nous avons ajouté de la CCK-8S (100 μ M, Tocris) au LCSa de manière à obtenir une concentration finale de 100 nM. Les tranches ont été perfusées avec ce traitement pendant 2h30 et l'effet sur les réponses tétaniques a été analysé à 1h, 1h30 et 2h de traitement.

➤ Pour l'étude de la période d'épilepsie chronique (P30-35) dans le modèle murin du SD, les tranches Hippocampo-Corticales ont été stimulées chimiquement par différentes solutions :

- LCSa contenant une forte concentration en potassium (LCSa high K⁺, 9 ou 12 mM) :

Les tranches soumises à une concentration de 9 mM de K⁺ ont été perfusées pendant 1h30 avec du LCSa composé de 118,75 mM de NaCl, 9 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂.6H₂O, 1.25 mM de NaH₂PO₄, 2 mM de MgSO₄, 26.5 mM de NaHCO₃ et 10 mM de glucose. Les tranches soumises à une concentration de 12 mM de potassium ont été perfusées pendant 1h30 avec du LCSa composé de 115,75 mM de NaCl, 12 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂.6H₂O, 1.25 mM de NaH₂PO₄, 2 mM de MgSO₄, 26.5 mM de NaHCO₃ et 10 mM de glucose. Des enregistrements en potentiel de champ ont été effectués tout au long du traitement.

- LCSa sans magnésium (LCSa Mg²⁺ free) :

Les tranches ont été perfusées avec du LCSa dépourvu de Mg²⁺ (NaCl : 124 mM, KCl : 3.75 mM, CaCl₂.6H₂O : 2 mM, NaH₂PO₄ : 1.25 mM, NaHCO₃ : 26.5 mM, glucose : 10 mM) pendant 2h30. Les activités ont été enregistrées en potentiel de champ à partir de 5 min de traitement, jusqu'à la fin. Les décharges épileptiformes ayant une durée inférieure à 2 secondes sont nommées décharges « **interictales** », les

décharges épileptiformes ayant une durée supérieure à 10 secondes sont nommées décharges « **ictales** » et celles comprises entre 2 et 10 secondes sont nommées décharges « **multicomponents** ».

- 4-aminopyridine (4-AP) :

Les tranches ont été perfusées pendant 1h30 avec du LCSa contenant 50 μ M de 4-AP (*Sigma*), un bloqueur des canaux potassiques, et les activités ont été enregistrées en potentiel de champ à partir de 20 min jusqu'à la fin du traitement. Comme précédemment, les décharges épileptiformes ayant une durée inférieure à 2 secondes sont nommées décharges « interictales », celles ayant une durée supérieure à 10 secondes sont nommées décharges « ictales » et celles comprises entre 2 et 10 secondes sont nommées « multicomponents ».

- Carbamazepine (CBZ) :

Les tranches perfusées avec la 4-AP ont ensuite été traitées avec de la 4-AP + CBZ (*Sigma*), un antiépileptique qui stabilise l'état inactif des canaux Na_v , afin de voir l'effet de ce « traitement » sur l'hyperexcitabilité induite par la 4-AP : après 1h30 de traitement avec la 4-AP seule, les tranches ont été perfusées avec de la 4-AP (50 μ M) + CBZ (50 μ M) pendant 1h et l'effet a été analysé à partir de 40-50 min.

2. Test des constructions visant à réduire l'excitabilité cérébrale *in vitro*

Ce projet étant une collaboration avec d'autres laboratoires (*Besta Neurological Institute, Milan, Italie ; University of Genova, Italie ; University of Modena, Italie*), je ne suis pas rentrée dans les détails des expériences qui n'ont pas été réalisées par moi-même, mais j'ai tout de même expliqué la méthodologie de manière simplifiée pour faciliter la compréhension des résultats.

• Développement des mi/shARN

Nos collaborateurs ont identifié un certain nombre de séquences capable de réduire l'expression des principaux canaux Na_v neuronaux ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$ et $Na_v1.6$) via un logiciel fourni par la société *Invitrogen*. Ils ont ainsi choisi deux séquences permettant de cibler le plus grand nombre de canaux Na_v . Ils ont ensuite utilisé un kit (*ThermoFischer, BLOCK-IT Pol II miR RNAi Expression Vector*) pour générer des plasmides capables d'exprimer des hybrides mi/shARN formés à partir des miARN endogènes murins (miARN 155) en remplaçant une partie de leur séquence par une séquence d'intérêt (shARN) permettant de réduire l'expression des canaux Na_v (Fig. 31). Puisqu'ils ont identifiés 2 séquences d'intérêt, deux mi/shARN sont produits dans chaque plasmide.

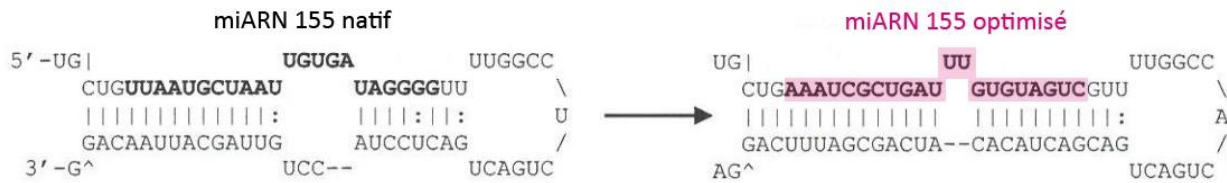


Fig. 31 : Génération du mi/shARN à partir du miARN 155. Représentation structurelle du miARN (gauche) et du remplacement d'une partie de sa séquence native par une séquence d'intérêt (droite).

Une protéine fluorescente verte est exprimée en amont de ces séquences afin de permettre un marquage des cellules. Ainsi la séquence contenant le gène de la protéine fluorescente GFP (vert) et les gènes des deux mi/shARN contre les canaux Na_v (rouge : miARN, souligné : séquences modifiées) est la suivante :

TTGTACAAAAAGCAGGCTTTAAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCAGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGAC
 GTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAA
 GCTGCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCGCCCGTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCT
 TCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCG
 AGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGACAAGCTGGAGTACAACCTAC
 AACAGCCACAAGGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGAGCCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGT
 GCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTG
 AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
 TAAGCTAAGCACTTCGTGGCCGTCGATCGTTTAAAGGGAGGTAGTGAGTCGACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGCA
 GGAGGCCGATGTTGAACGTTTTGGCCACTGACTGACGTTCAACAGGCCTCTGCTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAA
 ATGGCCAGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTTCTTCTGCTGGTTGAAGTTGGTTTTGGCCACTGACTGACCAACTCACAGCAGA
 AGAAAGAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCAGATCTGGCC

Comme contrôle, ils ont utilisé le même gène pour la protéine GFP (vert) et un mi/shARN possédant une séquence « brouillée », n'ayant pas de cible particulière (rouge : miARN, souligné : séquence modifiée) :

TTGTACAAAAAGCAGGCTTTAAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCAGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGAC
 GTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAA
 GCTGCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCGCCCGTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCT
 TCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCG
 AGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGACAAGCTGGAGTACAACCTAC
 AACAGCCACAAGGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGAGCCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGT
 GCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTG
 AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
 TAAGCTAAGCACTTCGTGGCCGTCGATCGTTTAAAGGGAGGTAGTGAGTCGACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAAAT
 GTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGCTCTCCACGCAGTACATTTAGG

Les cultures primaires de neurones corticaux ont été transfectées avec ces plasmides le jour de leur mise en culture et des analyses d'immunocytochimie et de patch-clamp ont été effectuées à 11 jours *in vitro* (jiv).

- **Tests des vecteurs viraux contenant les séquences mi/shARN**

La construction contenant les mi/shARN réduisant l'expression des canaux Na_v et la construction mi/shARN contrôle possédant une séquence « brouillée », ont été introduits par nos collaborateurs dans des plasmides lentiviraux de type pLL3.7. Le promoteur « U6 », permettant l'expression des séquences d'intérêt dans tous les types cellulaires et la séquence de la protéine fluorescente GFP sont placés en amont des deux séquences d'intérêt. Ainsi, la protéine fluorescente sera exprimée dans toutes les cellules dans lesquelles s'exprimeront ces constructions. L'efficacité de ces plasmides a été testée dans des cultures primaires de neurones corticaux par des analyses de quantification d'ADN (PCR quantitative ou *qPCR*), de détection protéique (*western blot*) et de marquage immunocytochimique.

Le vecteur lentiviral possède une faible capacité de diffusion, nous avons donc décidé par la suite d'utiliser un vecteur de type Adenovirus associé (AAV), ayant une meilleure capacité de diffusion. En effet, le vecteur AAV possède une plus petite capacité de taille pour l'insert (lentivirus : 8 kilo base (kb) / AAV : 4,5 kb), mais ce n'est pas un problème car nos constructions ne mesure que 3,4 kb. En revanche le vecteur AAV a donc une plus petite taille (lentivirus \approx 10 kb / AAV \approx 5 kb) ce qui lui donne une meilleure capacité de diffusion à travers les cellules et lui permet d'infecter un plus large volume cérébral. De plus le vecteur AAV n'engendre presque pas de réponse immunitaire et ne possède qu'une très faible capacité à s'intégrer dans le génome de l'hôte comparé au lentivirus.

Nos collaborateurs ont donc inséré les deux séquences mi/shARN contre les canaux Na_v ou la séquence contrôle dans des plasmides AAV, avec en amont un promoteur CamKIIa pour cibler spécifiquement les neurones excitateurs et la séquence de la protéine GFP afin de marquer les cellules infectées par de la fluorescence (Fig. 32A). Les séquences à traduire sont délimitées par deux séquences de lecture « ITR ». La taille totale du plasmide mesure 6,3 kb (Fig. 32B).

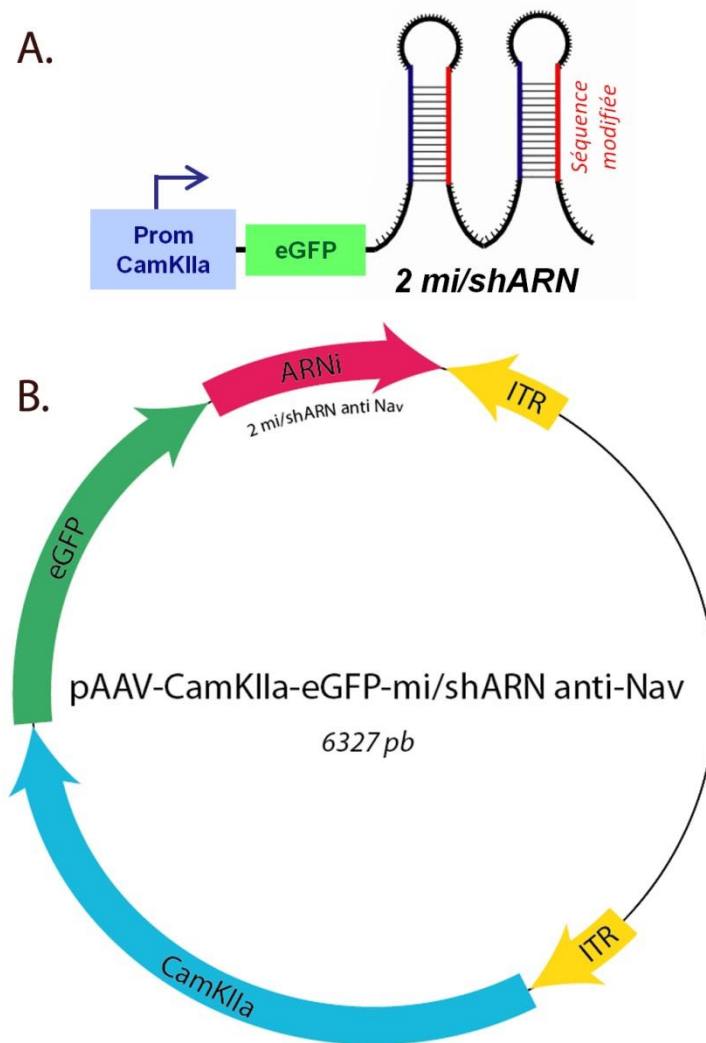


Fig. 32 : Construction virale contenant les mi/shARN contre les canaux Na_v. A) Représentation structurelle de la construction contenant le promoteur CamKIIa, la séquence de la protéine eGFP et les deux mi/shARN, B) Plasmide AAV contenant la construction « promoteur CamKIIa + eGFP + 2 mi/shARN » entre deux séquences de lecture « ITR ».

La validation de l'efficacité de ces plasmides a été testée dans des cultures de neurones corticaux transfectées à 3 jiv et l'effet a été observé à 14 jiv.

Nous avons ensuite décidé de produire les vecteurs viraux AAV contenant les séquences d'intérêt par le laboratoire d'amplification de vecteurs du CHU de Nantes et de les tester directement *in vivo*.

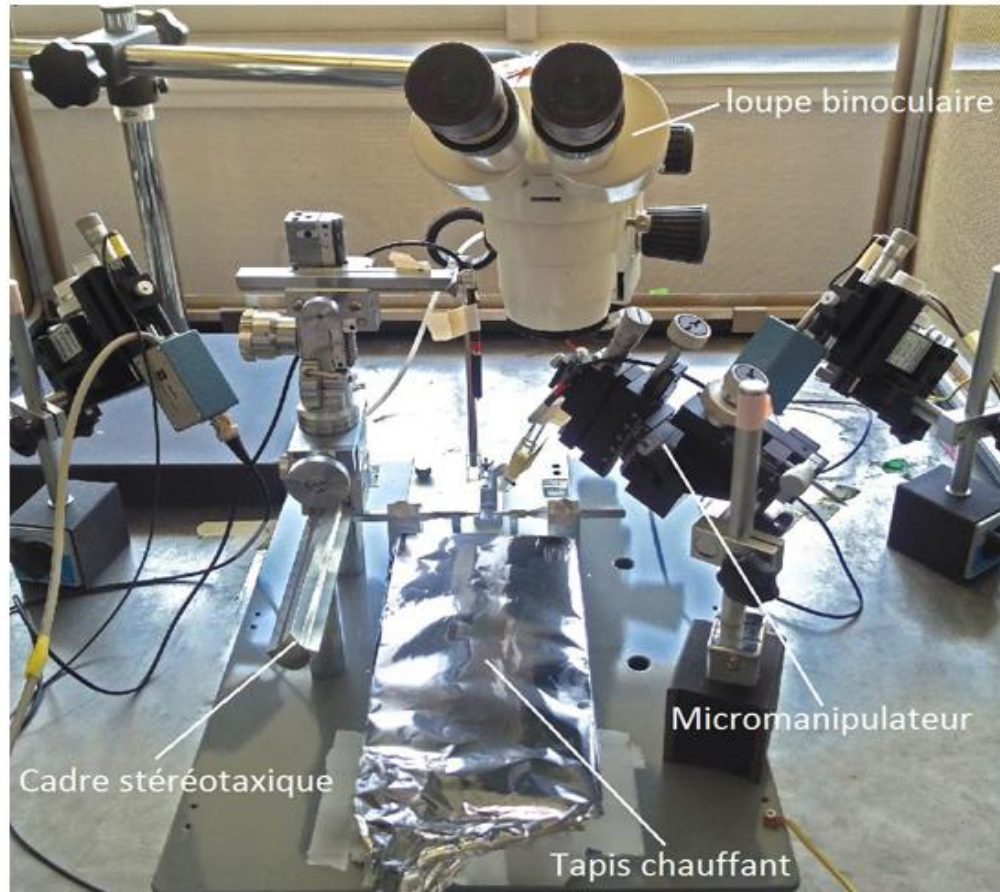
Expériences *in vivo*

1. Enregistrements extracellulaire de l'hippocampe et du cortex en période pré-épileptique sur le modèle murin du SD

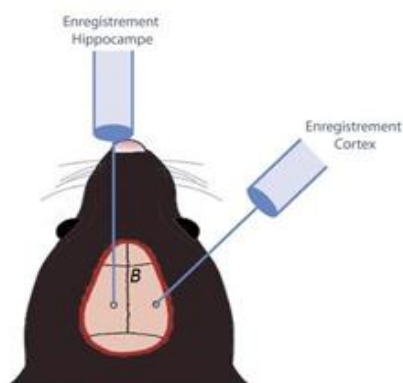
Les souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$ âgées de 16 à 19 jours sont anesthésiées grâce à une injection Intra-Péritonéale (IP) d'uréthane (1,8 g/kg, *Sigma*) dilué dans du PBS. Cet anesthésique est choisi car il permet de maintenir une activité cérébrale semblable à celle du sommeil lent (Clement et al., 2008). Afin de s'assurer du maintien de l'anesthésie, j'ai contrôlé le mouvement des vibrisses, le réflexe oculaire, le réflexe au pincement de la pâte et de la queue avant et pendant la chirurgie. Les souris sont placées sur le cadre stéréotaxique et leur température corporelle est maintenue à 37°C grâce à un tapis chauffant relié à un contrôleur de température (TCAT-2DF, *Physitemp, USA*) (Fig. 33A). Le rythme respiratoire est contrôlé grâce à un capteur de pression (*AdInstrument*) tout au long de l'expérience. La peau du scalp est coupée grâce à un scalpel, puis maintenue écartée grâce à des pinces « clamp ». Les coordonnées du bregma (point de rencontre entre l'os frontal et les os pariétaux) sont ensuite relevées (« B » sur la figure 33B) pour servir de point de référence au calcul des coordonnées antéropostérieures (AP) et latérales (Lat) pour les enregistrements de l'hippocampe et du cortex.

Sur des souris de cet âge, les coordonnées sont différentes de celles d'une souris adulte renseignées dans le « *Mouse Brain Atlas* » (Franklin & Paxinos). J'ai donc effectué des expériences pilotes pour trouver les coordonnées à P16-19 permettant de cibler l'hippocampe entre l'aire CA1 et le gyrus dentelé et le cortex comme représenté sur le schéma (Fig. 33C). Ainsi, les coordonnées utilisées pour cibler l'hippocampe sont de -2,2 mm AP et 2 mm Lat par rapport au Bregma et de -1,6 mm en profondeur par rapport à la surface du cerveau. Pour le cortex, elles sont de -2,2 mm AP et -3,5 mm Lat par rapport au Bregma et de -0,5 mm en profondeur par rapport à la surface du cerveau. Une perceuse est utilisée (*Foredom, ref: MH-170*) avec un foret de 0,2 mm (*Edenta, HM Bohrer, ref: C1.104.005*) afin de percer des trous dans le crâne et d'y insérer les électrodes grâce aux micromanipulateurs. J'ai utilisé des microélectrodes de tungstène (*WPI, USA, ref: TM33B01*) pour les enregistrements extracellulaires. L'acquisition des signaux électriques est effectuée à une fréquence de 0.1-5000 Hz et échantillonnée à 30 kHz, amplifiée grâce à un amplificateur (*Ex4-4 Quad Differential amplif, Dagan corporation*), convertie sous format numérique grâce à un système d'acquisition (*Digidata 1440A, Axon CNS Molecular Devices*) et enregistrée sur l'ordinateur avec le logiciel pClamp10.2 (*Axon Instruments, USA*).

A.



B.



C.

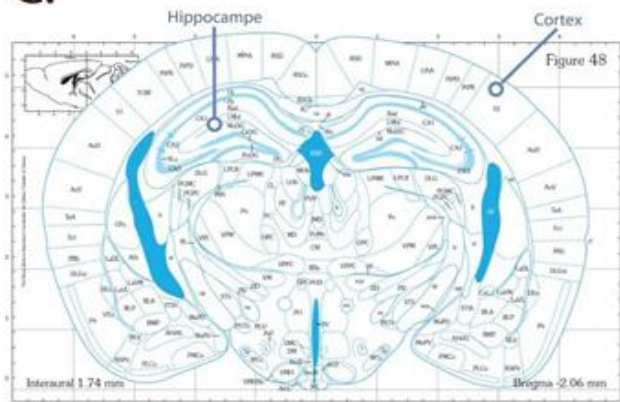


Fig. 33 : Enregistrement en potentiel de champ de l'hippocampe et du cortex *in vivo* en période pré-épileptique.
 A) Poste d'enregistrement en potentiel de champ *in vivo* avec un cadre stéréotaxique, un tapis chauffant, des micromanipulateurs et une loupe binoculaire, B) Schéma de la stéréotaxie pour introduire les électrodes d'enregistrement dans l'hippocampe et le cortex (dont les coordonnées ont été calculées à partir du Bregma « B »), C) Représentation approximative de la localisation des électrodes (hippocampe et cortex) d'après l'atlas de l'anatomie cérébrale chez la souris (Mouse Brain Atlas, Franklin & Paxinos).

Lors du maintien de la température corporelle à 37°C, les activités cérébrales spontanées sont enregistrées pendant 10 à 15 min. Ensuite la température corporelle est augmentée grâce à une lampe chauffante jusqu'à un maximum de 42°C afin de mimer une fièvre, puisque les premières crises apparaissant chez les patients atteints du SD sont majoritairement fébriles. Les enregistrements extracellulaires sont maintenus durant toute la durée de l'expérience.

Le spectre de puissance du signal a été obtenu et les activités supérieures à 0.2 mV d'amplitude ont été analysées pour leur fréquence, aire, durée, et amplitude sur une période d'environ 5 min.

L'analyse du spectre de puissance permet d'obtenir une représentation du signal dans le domaine fréquentiel. En effet, le spectre de puissance correspond à la répartition de la puissance d'un signal en fonction des fréquences. Le terme de « puissance » se rapporte à l'intensité du signal enregistré en fonction du temps (l'intensité est proportionnelle au carré de l'amplitude du signal).

Lors de l'analyse du spectre de puissance, les différentes fréquences peuvent interférer les unes avec les autres en créant des oscillations parasites. Des techniques mathématiques permettent de limiter une fenêtre d'observation afin de ne pas voir ces oscillations parasites. Dans notre étude, l'analyse des activités a été effectué avec le logiciel *Clampfit* en utilisant une fenêtre de *Hamming* (longueur de fenêtre : 4096 points, chevauchement de 50%), qui est la plus couramment utilisée pour l'analyse de ce type de signaux.

Les spectres de puissances ont été divisés en 3 intervalles de fréquences allant de 0.1 à 100 Hz, de 100 à 200 Hz et de 200 à 300 Hz, et ont été normalisés par rapport à la puissance totale des signaux de chaque intervalle de fréquence (intégrale du spectre). Les spectres de puissance normalisés sont représentés avec en abscisse la fréquence et en ordonnée la puissance normalisée exprimée selon une échelle logarithmique dans les intervalles de 0.1 à 100 Hz, de 100 à 200 Hz et de 200 à 300 Hz.

L'analyse statistique des spectres normalisés a été réalisée à différentes intervalles de bandes de fréquences : 0.5 à 1 Hz (oscillations lentes), 2 à 4 Hz (oscillations delta), 4 à 8 Hz (oscillations theta), 8 à 14 Hz (oscillations alpha), 30 à 90 Hz (oscillations gamma), 100 à 200 Hz et 200 à 300 Hz (oscillations haute fréquences).

Afin de vérifier la bonne localisation de l'électrode dans l'hippocampe, une électrode bipolaire (*WPI, USA, ref: TST33A001KT*) est insérée aux mêmes coordonnées que l'électrode d'enregistrement à la fin de l'expérience, pour effectuer une stimulation provoquant une brûlure au niveau de la zone enregistrée initialement (*Stimulateur : Isolated current source SIU91A, Cygnus technology, 30s à 40µA*). Le cerveau est ensuite retiré, collé sur un support à l'aide de colle cyanoacrylate et rapidement immergé dans une solution tampon phosphate salin (PBS : *Phosphate-buffered saline*) froid. Des coupes de 100µm sont ensuite effectuées à l'aide du microtome (*Microm HM 650V, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*) jusqu'à observer un trou correspondant à la brûlure à l'œil nu. Des expériences d'histochimie ont également été réalisées sur certaines tranches et sont détaillées à la page 76.

2. Effet de la stratégie visant à réduire l'excitabilité cérébrale *in vivo*

Seules les souris porteuses de la mutation hétérozygote KO pour le gène *Scn1a* (modèle du SD) ont été utilisées pour ces expériences, car les souris contrôles (WT) n'expriment pas de crise à l'âge adulte. Le vecteur viral contenant la construction ciblant les canaux Na_v est comparé au vecteur contenant la construction contrôle (possédant une séquence « brouillée »).

• Administration des constructions virales et implantation des électrodes

Les souris âgées de 30 à 38 jours ont été traitées un jour avant l'intervention avec un anti-inflammatoire non stéroïdien (*Ketofen 10 mg dilué dans 250 ml d'eau, Merial*). Au moment de la chirurgie, elles sont anesthésiées avec un mélange de Kétamine (*Virbac, 100 mg/kg*) et Xylazine (*Rompun 2%, 20 mg/kg*) administré en IP et sont maintenues à une température adéquate à l'aide de chaufferettes (environ 37°C) durant toute la durée de l'anesthésie. La profondeur de l'anesthésie est vérifiée (grâce à l'absence de mouvement des vibrisses, de réflexe oculaire, du pincement de la pâte et de la queue) tout au long de la chirurgie et les souris sont ré-anesthésiées avec 20 μ l du mélange kétamine-xylazine en cas de réponse à l'un des réflexes testés. Après avoir vérifié la profondeur de l'anesthésie, la souris est rasée au niveau du crâne et placée sur le cadre stéréotaxique. Du gel ophtalmique (*Dexpanthénol 10g, Bausch Lomb*) est placé sur ses yeux et un nettoyage de la zone d'incision est réalisée avec de la Bétadine avant d'injecter un anesthésique local (*Lidocaïne 21,33 mg/ml, Xylovet*) en sous-cutané afin de palier tout risque de douleur. La peau du crâne est ensuite coupée avec un scalpel, puis maintenue écartée grâce à des pinces. Les coordonnées du bregma (« B » sur la photo) sont ensuite relevées pour servir de point de référence au calcul des coordonnées antéropostérieures (AP) et latérales (Lat) des sites d'injections de virus et d'implantation d'électrodes (Fig. 34A).

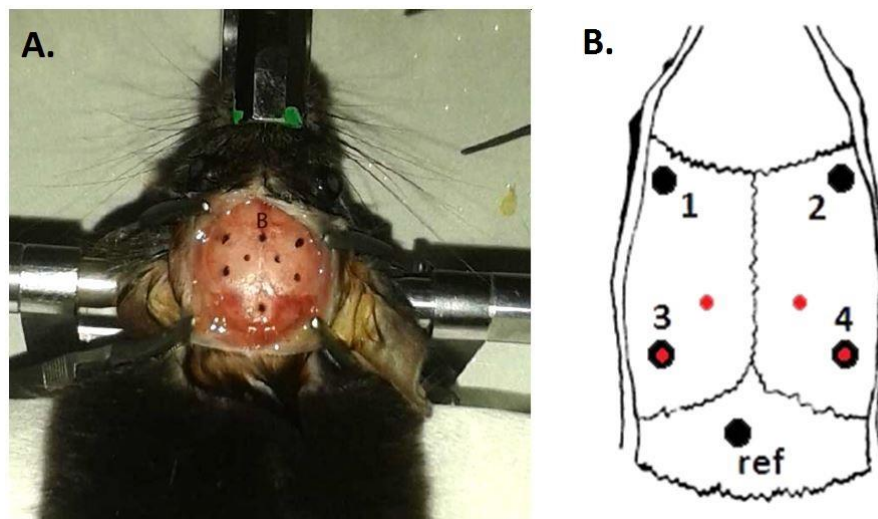


Fig. 34 : Stéréotaxie pour les injections des constructions virales et l'implantation d'électrodes.

A) Photo de la tête de la souris maintenue sur le cadre stéréotaxique avec les coordonnées des sites d'injection et d'implantation (points noirs) relevés en prenant le Bregma « B » comme référence. B) Schéma représentatif des sites d'implantation des quatre électrodes d'enregistrement (1, 2, 3 et 4) et de l'électrode de référence (ref) (points noirs), ainsi que des sites d'injection de virus (points rouges).

Afin d'éviter d'endommager la dure-mère, j'utilise un foret manié manuellement pour effectuer délicatement les trous qui doivent être de la même taille que les vis reliées aux électrodes qui seront insérées par la suite (0.95 mm de diamètre).

Les coordonnées utilisées pour l'implantation des électrodes (calculées par rapport au Bregma), représentées en noir sur le schéma de la [figure 34B](#), sont :

- 1) Antéro-Postérieur (AP) : 0 mm / Latéral (lat) : +3 mm
- 2) AP : 0 mm / Lat : -3 mm
- 3) AP : -3 mm / Lat : + 3 mm
- 4) AP : - 3 mm / Lat : -3 mm
- 5) AP : -6 mm / Lat : ± 0.2 mm

Deux des trous effectués pour l'implantation d'électrodes sont localisés au même endroit que pour les injections de virus. Deux autres trous sont effectués avec la perceuse (*Foredom, ref : MH-170*) et un foret de 0,2 mm (*Edenta, HM Bohrer, ref : C1.104.005*).

Les coordonnées pour l'injection de virus, représentées en rouge sur le schéma de la [figure 34B](#) (deux profondeurs différentes par trou), sont :

- 1) AP : -2 mm / Lat : +1.5 mm / Profondeur (Prof) : -1.8 mm
- 2) AP : -2 mm / Lat : +1.5 mm / Prof : -1.2 mm
- 3) AP : -2 mm / Lat : -1.5 mm / Prof : -1.8 mm
- 4) AP : -2 mm / Lat : -1.5 mm / Prof : -1.2 mm
- 5) AP : -3 mm / Lat : +3 mm / Prof : -3 mm
- 6) AP : -3 mm / Lat : +3 mm / Prof : -2 mm
- 7) AP : -3 mm / Lat : -3 mm / Prof : -3 mm
- 8) AP : -3 mm / Lat : -3 mm / Prof : -2 mm

Les vecteurs viraux sont ensuite administrés à l'aide d'une seringue Hamilton (10 μ l, modèle 1701 RN SYR, ref : 80014) au niveau des 8 sites d'injections à une vitesse de 0,2 μ l/min.

Deux expériences ont été réalisées avec des concentrations et volumes de virus injectés différents. Ainsi, pour les titres élevés de virus injectés (AAV-CamKIIa-eGFP-Neg : 2.10^8 particules infectieuses (pi)/ml ; AAV-CamKIIa-eGFP anti N_{av} : 2.10^9 pi/ml) j'ai injecté 1 μ l de virus par site, alors que pour les expériences avec des titres de virus plus modérés (AAV-CamKIIa-eGFP-Neg : 1.10^8 pi/ml ; AAV-CamKIIa-eGFP anti N_{av} : 2.10^8 pi/ml) j'ai injecté 0,5 μ l de virus par site.

Après avoir retiré la seringue Hamilton, les électrodes (*Bilaney, Plastics One, ref : E363/96/1.6/Spc*) sont visées (1/2 à 1 tour de rotation) à 5 emplacements (4 électrodes d'enregistrement et une électrode de référence) et le maintien des vis est consolidé grâce à du ciment dentaire (Super Bond, Phymep). Les embouts des électrodes sont introduits dans un connecteur ([Fig. 35A](#)) et le tout est maintenu grâce à de la résine polymérisante (Dentalon, Phymep) formant un « chapeau » sur la tête de la souris ([Fig. 35B](#)).

A la fin de la chirurgie, un anesthésique local en gel (*Xylocaïne visqueuse 2%, AstraZeneca*) est placé sur le contour de la plaie et une solution saline (NaCl 0,9%) est injectée en sous-cutanée pour réhydrater la souris. Cette dernière est replacée dans une cage propre, maintenue au chaud et surveillée jusqu'à son réveil. L'anti-inflammatoire non stéroïdien (*Ketofen 10 mg dilué dans 250 ml d'eau, Merial*) continu à être administré pendant 1 semaine après la chirurgie.

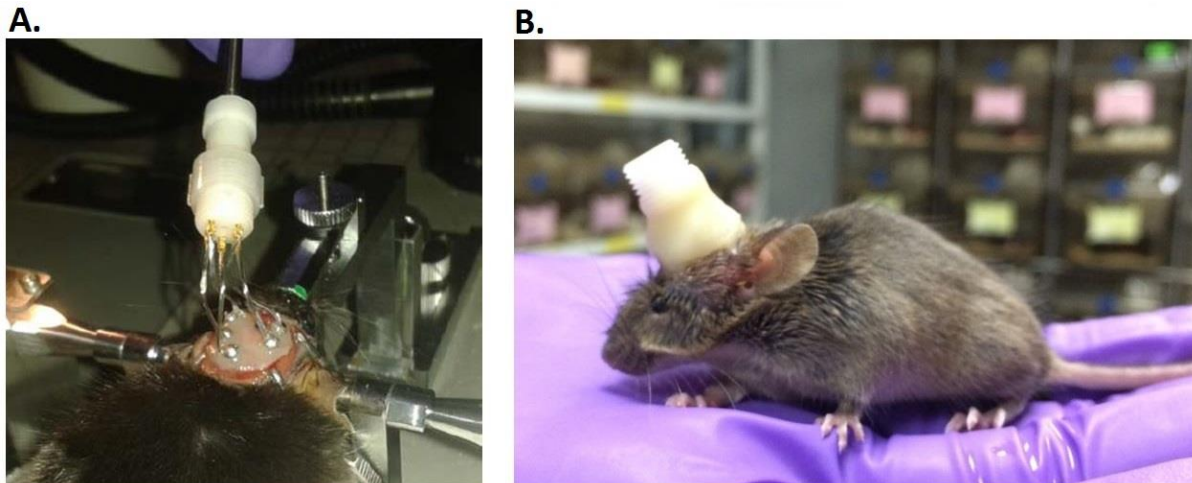


Fig. 35 : Réalisation du « chapeau » reliant les électrodes au connecteur.

A) Le maintien des électrodes vissées sur le crâne a été consolidé avec du ciment dentaire et les fils des électrodes sont branchés à un connecteur. B) Le connecteur est fixé à l'aide d'une résine polymérisante formant un « chapeau » sur la tête de la souris.

• Enregistrements vidéo-ECoG

Après 15 jours de repos, les souris hétérozygotes $Na_v1.1^{+/-}$ sont placées dans des cages aménagées pour permettre les enregistrements vidéo-ECoG et sont soumises à un cycle 12h jour/12h nuit avec une lumière rouge (non visible par les souris) permettant de poursuivre les enregistrements vidéo la nuit. Le connecteur sur leur tête est branché à un câble lui-même relié à un adaptateur rotatif, permettant de leur donner une bonne liberté de mouvement (Fig.36A). Ce système est relié à des amplificateurs (*AnimalBio Amp, ADInstruments*) et à un système d'acquisition (*PowerLab 16/35, ADInstruments*) permettant de convertir les signaux sous format numérique afin d'être restitués sur ordinateur par le logiciel d'acquisition et d'analyse (*Labchart 8, ADInstruments*). Nous possédons 16 amplificateurs permettant d'enregistrer simultanément 16 électrodes (Fig. 36B), ce qui nous donne la possibilité d'enregistrer simultanément 4 souris possédant 4 électrodes d'enregistrements chacune, ou 8 souris possédant 2 électrodes d'enregistrements chacune. Les premières expériences ont été réalisées avec 4 souris pour avoir plus d'électrodes couvrant la surface cérébrale, mais puisque toutes les crises observées sont généralisées, nous avons décidé de diminuer le nombre d'électrodes à 2 par souris pour certaines d'entre elles afin de pouvoir en enregistrer 8 simultanément. Un système de 4 caméras (*Day&Night, Ganz*) reliées de manière synchrone au système ECoG permet de visualiser les crises.

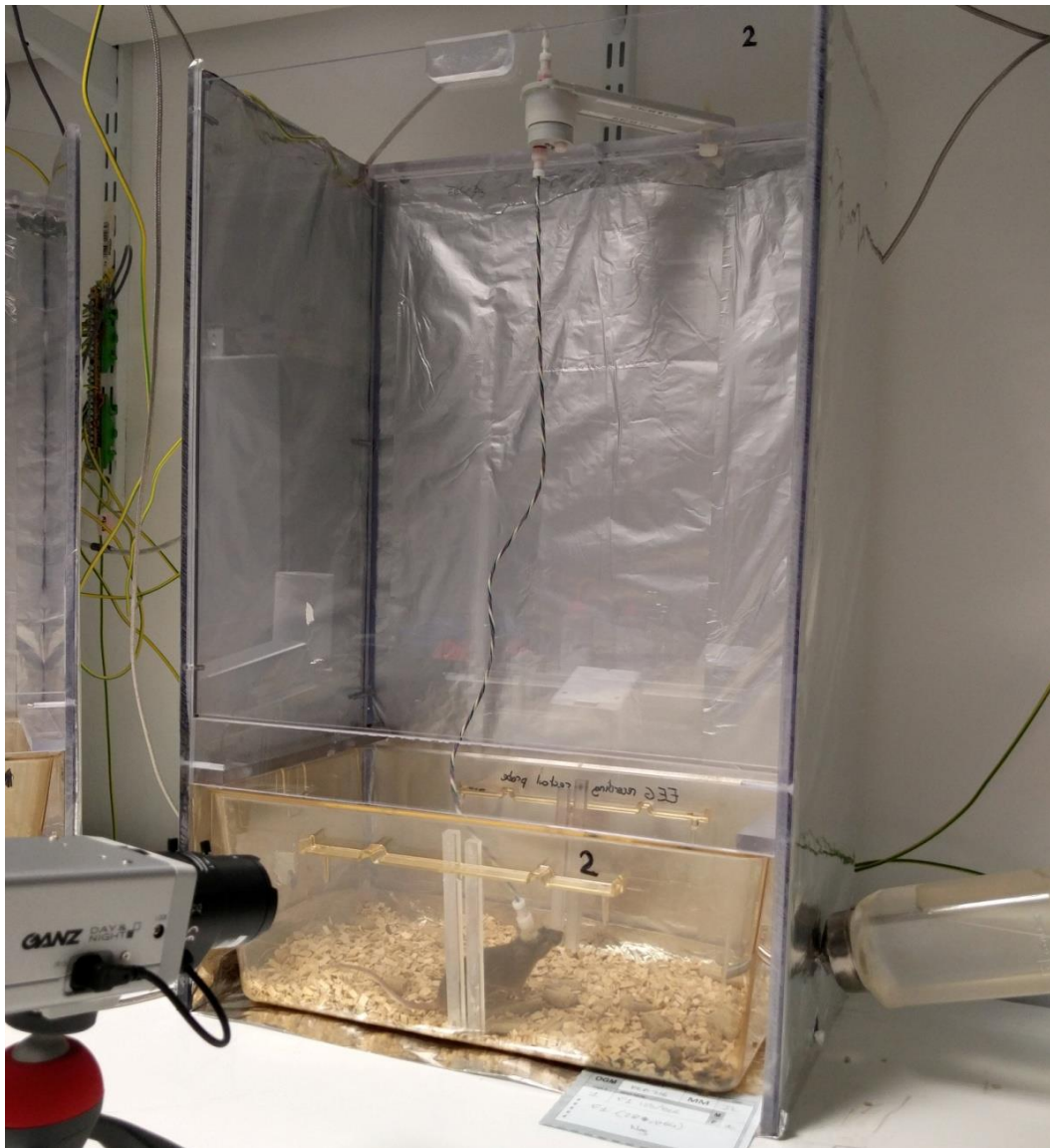


Fig. 36 : Enregistrement vidéo-EECoG des souris $Na_v1.1^{-/-}$ injectées avec les constructions virales et implantées avec des électrodes de contact. A) Caméra filmant la cage d'enregistrement dans laquelle se trouve une souris dont le connecteur est relié à un adaptateur rotatif (lui donnant une liberté de mouvement). B) Amplificateurs et système d'acquisition permettant d'enregistrer 16 électrodes simultanément (4 souris possédant 4 électrodes d'enregistrement).

Après une journée d'habituatation, les souris sont enregistrées pendant 5 jours consécutifs, puis soumises à une induction de crise par hyperthermie et de nouveau enregistrées par vidéo-ECoG 5 autres jours consécutifs (Fig.37). Seules les crises d'au moins 10 secondes, supérieures à 1.6 mV d'amplitude sur l'ECoG et dont les mouvements cloniques sont visibles sur la caméra ont été considérées pour l'analyse.



Fig. 37 : Protocole d'enregistrement vidéo-ECoG des souris $Na_v1.1^{+/-}$ 16 jours après les injections de vecteurs viraux. Les crises spontanées sont enregistrées pendant 5 jours, puis les souris sont soumises à une hyperthermie, avant d'enregistrer de nouveau les crises spontanées pendant 5 jours.

• Induction de crises par hyperthermie

21 jours après l'injection de vecteurs AAV, les souris hétérozygotes $Na_v1.1^{+/-}$ sont soumises à une induction de crises par hyperthermie. La température corporelle des souris est mesurée grâce à une sonde rectale reliée à un contrôleur de température (TCAT-2DF, Physitemp, USA). Après une période d'habituatation de 2 à 5 min, une lampe chauffante permet d'augmenter la température corporelle par palier (maintien d'une température stable pendant 2 min à chaque degré), jusqu'à un maximum de 42,5°C. Si une crise survient avant cette température, la lampe chauffante est immédiatement arrêtée et la température corporelle, la sévérité et la durée de la crise sont notés. L'expérience est enregistrée par vidéo-ECoG, comme expliqué ci-dessus.

Pour déterminer la sévérité des crises, je me suis basée sur l'échelle de Racine (ER) :

- Niveau 1 : mouvements de la bouche et de la face (très difficile à discerner)
- Niveau 2 : hochements de tête
- Niveau 3 : tremblements des membres (clonies)
- Niveau 4 : clonies + redressement du corps, voir perte d'équilibre
- Niveau 5 : clonies + chute + sauts incontrôlés
- Niveau 6 : mort

Afin d'éviter tout doute, seules les crises à partir du niveau 3 ont été prises en compte.

La souris est replacée dans sa cage à la fin de l'expérience afin d'être enregistrée par vidéo-ECoG pendant encore 5 jours.

- **Quantification de l'expression des gènes des canaux Na_v**

Les hippocampes des souris ayant été injectés avec le vecteur contrôle ou le vecteur contenant les mi/shARN contre les canaux Na_v ont été prélevés à la fin des expériences (à environ P60), placés dans des tubes et immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Ils ont ensuite été délicatement broyés dans un mortier jusqu'à obtenir une poudre fine. Environ 10mg de cette poudre est resuspendu dans 1 ml de Trizol (*Life technology*) et les ARN totaux ont été purifiés avec 2 cycles d'extraction au chloroforme selon les instructions du fabricant (*Thermo Fisher Scientific*). La transcription inverse a été réalisée à 50°C pendant 1h avec 1 µg d'ARN dilué dans 20 µl d'un mélange contenant l'enzyme « *reverse transcriptase SuperScript III* » (*Thermo Fisher Scientific*), le tampon de l'enzyme, des dNTP, des oligonucléotides (oligo-dT, *Thermo Fisher Scientific*) et des hexanucleotides de séquence aléatoire.

Les réactions de qPCR ont été effectuées avec 1 µl d'ADN complémentaires (ADNc) dilués 2.5 fois dans un mélange de réactifs « 2X qPCR Mastermix » (*Eurogentec*) avec des couples d'amorces spécifiques des ARN d'intérêt (préalablement validés) et l'amplification a été réalisée dans un thermocycleur « *Light Cycler 480* » (*Roche*). Les valeurs des « Crossing points » (Cp) de chaque gène (Fig. 38), correspondant au seuil de détection lors de l'augmentation exponentielle de fluorescence, sont calculées par le thermocycleur grâce à la méthode du « maximum de la seconde dérivée » (*Roche*).

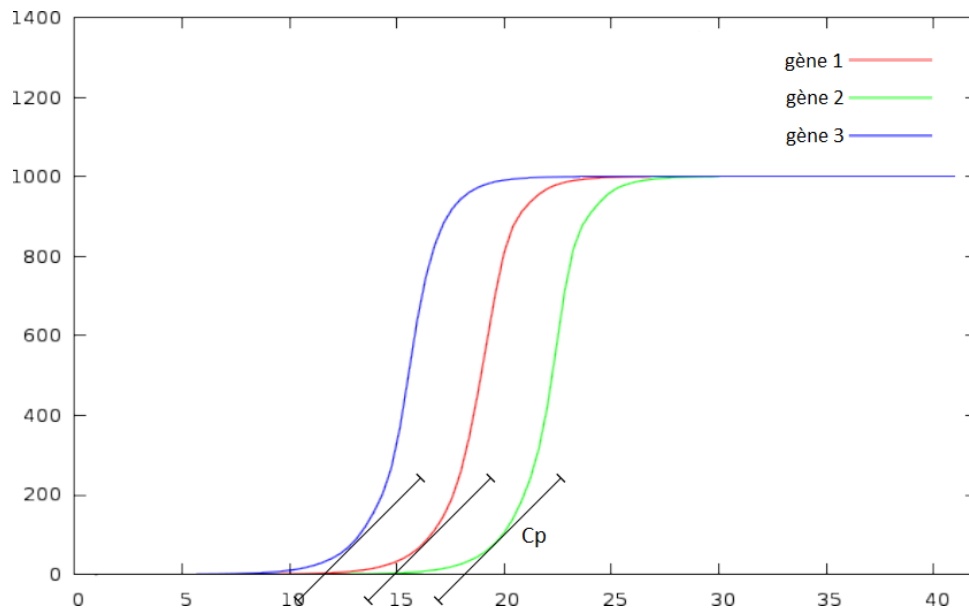


Fig. 38 : Exemple de la représentation graphique d'une qPCR. L'axe des ordonnées correspond à la fluorescence relative et l'axe des abscisses au nombre de cycles d'amplification réalisés. On note une augmentation de fluorescence pour 3 gènes et la méthode de calcul du « maximum de la seconde dérivée » permet de déterminer les seuils de détection de fluorescence (Cp) de chaque gène.

Les résultats de la qPCR ont ensuite été calculés en utilisant une méthode dérivée de la méthode dite du « ddCp » qui permet d'utiliser plusieurs gènes de ménage dans les calculs : L'expression du gène x dans l'échantillon A est rapporté à l'expression du gène x dans un échantillon contrôle (*ech. Ctrl.*)

$$\text{Ainsi, } dCp \text{ gène } x = (Cp \text{ gène } x_{ech. Ctrl.}) - (Cp \text{ gène } x_{ech. A})$$

Ensuite, l'expression relative des gènes d'intérêt est normalisée par rapport à l'expression de 4 gènes de ménage (*gène m.*): la β -actine (β -act.), la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*gapdh*), le glutamate décarboxylase (*gad2*) et la protéine de liaison tata (*tata binding protein = tbp*) sont utilisés comme références (*ref*). En effet, l'expression de ces gènes n'est pas censée être affectée par nos conditions expérimentales.

Pour cela on soustrait l'expression de chaque gène de ménage de l'échantillon A à l'expression du même gène de ménage de l'échantillon contrôle.

Au final, l'expression relative du gène x dans l'échantillon A par rapport à l'échantillon contrôle est obtenue par la formule ci-dessous :

$$\text{Ratio} = 2^{\left(\frac{dCp \text{ gène } x}{(2^{dCp \beta \text{ act}} * 2^{dCp \text{ gapdh}} * 2^{dCp \text{ gad2}} * 2^{dCp \text{ tbp}})^{\frac{1}{4}}} \right)}$$

La comparaison de ces valeurs permet d'analyser la variation d'expression d'un gène dans différents échantillons.

Les amorces utilisées pour amplifier les différents ARNs sont les suivantes :

Gène (protéine)	Amorce « sens »	Amorce « anti-sens »
β -actine	5'-ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3'	5'-CACAGGATTCCATACCCAAGA-3'
GAPDH	5'-CCGCATCTTCTTGTGCAGTGCC-3'	5'-AGACTCCACGACATACTCAGCACC-3'
GAD2	5'-CTCTGCGGATCCTGAGAACC-3'	5'-TCTCCATAGAGCAGAGCGCA-3'
TBP	5'-AGGCCAGACCCCAACTC-3'	5'-GGGTGGTGCCTGGCAA-3'
Scn1a (Nav1.1)	5'-TTCGCACTCATCGGGTTGC-3'	5'-CTCAAGGGAAGCGTTGGTG-3'
Scn2a (Nav1.2)	5'-TGGAAGGACAAAACGATGCTC-3'	5'-GCTGAAGGTGTCAAACCTCGTG-3'
Scn3a (Nav1.3)	5'-AGTGGCCTCCAAGCGATTC-3'	5'-TCTGCGATATAGTCCTCCAGTT-3'
Scn8a (Nav1.6)	5'-CCCGACAGTTTCAAGCCTTTC-3'	5'-CGTCAAATAGTACGGGTCAAAGT-3'

Microscopie et (Immuno)histochimie

1. Perfusion intracardiaque de Paraformaldéhyde

Les souris sont anesthésiées avec environ 300 mg/kg de pentobarbital sodique (*Ceva Santé animale, 54,7 mg/ml*) administré via une injection IP et l'absence de réflexes de pression oculaire, de pincement de la patte et de la queue est testée avant de poursuivre la manipulation. Le thorax de l'animal est ensuite ouvert à l'aide d'une paire de ciseaux afin de laisser apparaître le cœur. Une incision est effectuée au niveau de l'oreillette droite afin de laisser s'évacuer le sang et une aiguille est introduite dans le ventricule gauche (Fig. 39) afin de perfuser toute la circulation sanguine avec 20 ml de PBS 1x (*Sigma-Aldrich*), puis avec 20 ml de Paraformaldéhyde 4% (*PFA 4%, EMS*) permettant la fixation des cellules. Le cerveau est ensuite prélevé et immergé dans du PFA 4% pendant 48 à 72h avant d'être rincé au PBS.

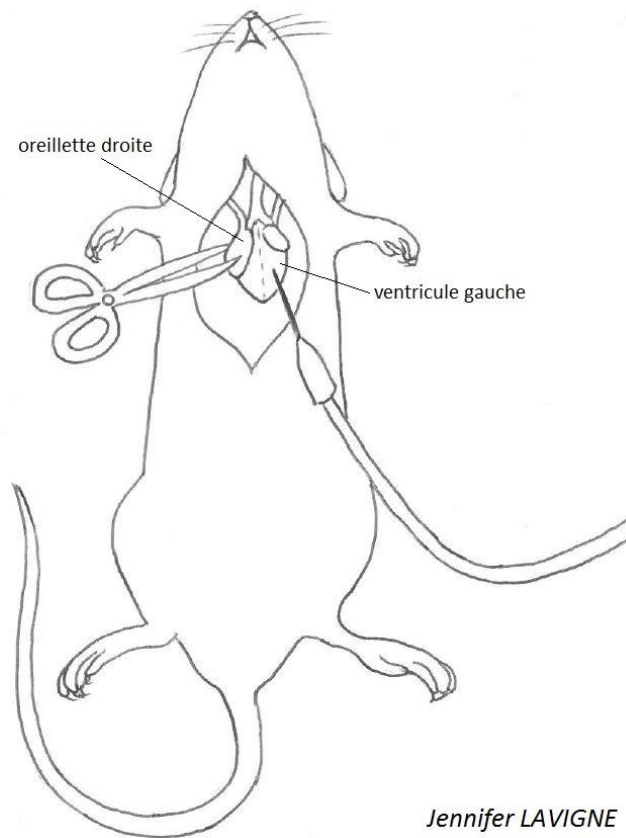


Fig. 39 : Dessin illustrant la perfusion intracardiaque.

Le thorax de la souris anesthésiée est ouvert afin de laisser apparaître le cœur. L'aiguille permettant la perfusion est insérée dans le ventricule gauche et l'oreillette droite est coupée afin de laisser s'écouler le sang.

2. Histochimie

Certaines souris utilisées pour l'étude du SD en période pré-épileptique, sur lesquelles j'ai effectué des enregistrements extracellulaires de l'hippocampe et du cortex, ont été fixées et leur cerveau prélevé afin de visualiser la zone enregistrée dans l'hippocampe.

J'ai effectué des tranches de 40 µm d'épaisseur dans du PBS froid (4°C) à l'aide du microtome (*Microm HM 650V, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*) sur lesquelles j'ai ensuite fait une coloration histologique de Nissl en les trempant 30 secondes dans du Cresyl Violet (*Sigma-Aldrich*). Après plusieurs rinçages à l'eau déminéralisée, les tranches ont été montées entre lame et lamelle. Les photos ont été réalisées à un grossissement x4 grâce à un microscope d'histologie (*Leica DMD108*).

3. Immunohistochimie

Certaines souris porteuses de la mutation du SD, injectées avec les constructions virales ciblant les canaux Na_v et les constructions contrôles, ont été fixées et leur cerveau prélevé afin de visualiser la dispersion des vecteurs viraux et les types cellulaires infectés par les vecteurs.

J'ai effectué des tranches de 40 µm d'épaisseur dans du PBS froid (4°C) à l'aide du microtome (*Microm HM 650V, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*). Les tranches sont tout d'abord incubées 30 min dans du PBS contenant du Triton 0.1% (afin de perméabiliser les membranes cellulaires) et des protéines permettant de bloquer les sites aspécifiques : 0.5% Sérum bovin (BSA) et 10% Sérum de chèvre (NGS). Les tranches sont ensuite incubées 48h à 4°C avec un anticorps (Ac) primaire de lapin dirigé contre le GABA (*Ac polyclonal Anti-GABA Rabbit, Sigma Aldrich, ref : A2052, dilution 1/2000*), dilué dans le milieu contenant du PBS 1X + 0.1% Triton + 0.5% BSA + 1% NGS. Après plusieurs rinçages au PBS, les tranches sont incubées 24h à 4°C avec le milieu PBS 1X + 0.1% Triton + 0.5% BSA + 1% NGS dans lequel est dilué l'Ac secondaire de chèvre anti-lapin (*Ac goat anti-mouse Alexa Fluor 647, Thermofisher Scientific, ref : A21236, dilution 1/1000*). Les tranches sont ensuite montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage pour immunofluorescence (*Fluoprep, ref : 75521, Biomérieux*). Les images ont été réalisées avec un microscope confocal (FV10i Olympus) à un grossissement x10 et x60.

Tests statistiques

La comparaison des données est exprimée en moyenne ± erreur standard. La comparaison statistique des données est réalisée par des tests de *Student* lorsque l'effectif des données le permet et que la distribution est normale, ou de *Mann-Whitney* le cas échéant, avec un seuil de significativité de 0.05 (*p < 0.05).

Des tests de Kolmogorov-Smirnov ont également été réalisés pour l'analyse des distributions de la puissance spectrale des activités cérébrales en fonction de leurs bandes de fréquences.

Partie I :
Etude de la période
pré-épileptique

Dans des modèles classiques d'épilepsie étudiés (en particulier l'épilepsie du lobe temporal), « l'épileptogenèse » est la période critique durant laquelle des réarrangements des réseaux neuronaux se mettent en place provoquant par la suite la génération et la récurrence des crises épileptiques. Dans le cas de l'EGCF+ et du SD qui sont dues à des mutations du canal $Na_v1.1$, on parle de « période pré-épileptique » quand le canal $Na_v1.1$ commence à être exprimé mais que les crises ne sont pas encore apparues. Dans cette fenêtre de temps, il pourrait y avoir des réarrangements au sein des réseaux neuronaux, comme ceux qui se mettent en place lors de l'épileptogenèse observée dans des modèles d'épilepsies classiques.

Dans nos modèles murins, les souris WT commencent à exprimer la protéine $Na_v1.1$ à 10 jours postnataux (P10), mais son expression n'est significative qu'à partir de 14 jours (P14). Le pic d'expression se situe entre 20 et 30 jours (P20-P30), moment où les souris possédant une mutation perte de fonction du canal $Na_v1.1$ commencent à développer les crises récurrentes.

La période pré-épileptique pour nos modèles murins se situe entre le moment où le canal $Na_v1.1$ est censé être exprimé de façon significative, mais avant l'apparition de l'épilepsie. Nous avons donc choisi d'étudier les modèles de l'EGCF+ et du SD entre 14 et 20 jours postnataux (P14-20) afin de distinguer des signes de pathomécanismes à l'origine de la génération de l'épilepsie.

EGCF+ : Période pré-épileptique

Pour l'étude de la période pré-épileptique sur le modèle de l'EGCF+ nous avons décidé d'explorer en parallèle l'impact de la mutation KI R1648H affectant le canal $Na_v1.1$ au niveau des propriétés intrinsèques des neurones et au niveau du réseau neuronal de la boucle thalamo-corticale (TC). Les expériences ont été réalisées dans des tranches de cerveaux prélevés sur de jeunes souris (P14-20) présentant la mutation hétérozygote $Na_v1.1^{RH/+}$ (similaire à la mutation observée chez les patients) et des souris WT provenant des mêmes portées. Afin de mieux comprendre l'altération fonctionnelle des canaux sodiques, quelques expériences ont également été réalisées sur des souris possédant la mutation homozygote $Na_v1.1^{RH/RH}$.

Des membres du laboratoire ainsi que des collaborateurs ont tout d'abord effectué des enregistrements de patch clamp sur différents sous-types neuronaux du réseau TC, mais également du cortex somatosensoriel (S1) et de l'hippocampe.

Je me suis ensuite intéressée à l'impact de cette mutation au niveau du réseau neuronal en enregistrant simultanément différentes structures du réseau TC en potentiel de champ.

Les expériences effectuées ont conduit à la publication d'un article scientifique présenté dans les pages suivantes (84 à 99).

Impaired Action Potential Initiation in GABAergic Interneurons Causes Hyperexcitable Networks in an Epileptic Mouse Model Carrying a Human Na_v1.1 Mutation

Ulrike B.S. Hedrich,¹ Camille Liautard,^{2,3} Daniel Kirschenbaum,¹ Martin Pofahl,^{4,5} Jennifer Lavigne,^{2,3} Yuanyuan Liu,¹ Stephan Theiss,^{6,7} Johannes Slotta,^{6,7} Andrew Escayg,⁸ Marcel Dihné,¹ Heinz Beck,^{4,5} Massimo Mantegazza,^{2,3} and Holger Lerche¹

¹Department of Neurology and Epileptology, Hertie Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany, ²Institute of Molecular and Cellular Pharmacology, Laboratory of Excellence Ion Channel Science and Therapeutics, CNRS UMR 7275, 06560 Valbonne, France, ³University of Nice Sophia Antipolis, 06103 Nice, France, ⁴Department of Epileptology, University of Bonn Medical Center, 53105 Bonn, Germany, ⁵German Center for Neurodegenerative Diseases within the Helmholtz Association, 53175 Bonn, Germany, ⁶Institute of Clinical Neuroscience and Medical Psychology, Medical Faculty, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany, ⁷RESULT Medical, 40219 Düsseldorf, Germany, and ⁸Department of Human Genetics, Emory University, Atlanta, Georgia 30322

Mutations in *SCN1A* and other ion channel genes can cause different epileptic phenotypes, but the precise mechanisms underlying the development of hyperexcitable networks are largely unknown. Here, we present a multisystem analysis of an *SCN1A* mouse model carrying the Na_v1.1-R1648H mutation, which causes febrile seizures and epilepsy in humans. We found a ubiquitous hypoexcitability of interneurons in thalamus, cortex, and hippocampus, without detectable changes in excitatory neurons. Interestingly, somatic Na⁺ channels in interneurons and persistent Na⁺ currents were not significantly changed. Instead, the key mechanism of interneuron dysfunction was a deficit of action potential initiation at the axon initial segment that was identified by analyzing action potential firing. This deficit increased with the duration of firing periods, suggesting that increased slow inactivation, as recorded for recombinant mutated channels, could play an important role. The deficit in interneuron firing caused reduced action potential-driven inhibition of excitatory neurons as revealed by less frequent spontaneous but not miniature IPSCs. Multiple approaches indicated increased spontaneous thalamocortical and hippocampal network activity in mutant mice, as follows: (1) more synchronous and higher-frequency firing was recorded in primary neuronal cultures plated on multielectrode arrays; (2) thalamocortical slices examined by field potential recordings revealed spontaneous activities and pathological high-frequency oscillations; and (3) multineuron Ca²⁺ imaging in hippocampal slices showed increased spontaneous neuronal activity. Thus, an interneuron-specific generalized defect in action potential initiation causes multisystem disinhibition and network hyperexcitability, which can well explain the occurrence of seizures in the studied mouse model and in patients carrying this mutation.

Key words: epilepsy; genetics; ion channel; mouse model; network activity

Introduction

Voltage-gated ion channels play a pivotal role in initiation and conduction of action potentials (APs). Four subunits constitute

the major brain isoforms of voltage-gated Na⁺ channels (Na_vs). Among these, the most relevant gene affected in neuropsychiatric disorders is *SCN1A*, encoding the Na_v1.1 subunit. *SCN1A* mutations cause a variety of symptoms including febrile seizures and epilepsy, ataxia, mental decline, and headache (Marini and Mantegazza, 2010). Disorders caused by *SCN1A* mutations include generalized/genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+; Escayg et al., 2000), Dravet syndrome (DS; Claes et al., 2001), and

Received Feb. 20, 2014; revised Aug. 29, 2014; accepted Sept. 18, 2014.

Author contributions: U.B.S.H., H.B., M.M., and H.L. designed research; U.B.S.H., C.L., D.K., M.P., J.L., Y.L., M.D., H.B., M.M., and H.L. performed research; S.T., J.S., and A.E. contributed unpublished reagents/analytic tools; U.B.S.H., C.L., D.K., M.P., J.L., Y.L., S.T., M.D., M.M., and H.L. analyzed data; U.B.S.H., H.B., M.M., and H.L. wrote the paper.

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grants Le1030/10-1/2 to H.L. and SFB 1089 to H.B.), the Bundesministerium für Bildung und Forschung (National Genome Research Network/Epilepsy and Migraine integrated network Grants 01GS08123 and 01GS08122 to H.L. and H.B.; EuroTransBio/ESSENCE Grant FKZ0315641A to M.D., S.T., and J.S.), the European Commission (Grant EPICURE, LSHM-CT-2006-037315 to H.L., M.M., and H.B.), Laboratory of Excellence Ion Channel Science and Therapeutics (to M.M.), and the Fondation Recherche Médicale (to M.M.). Research for this publication was supported by the National Institute of Neurological Disorders and Stroke of the National Institutes of Health under Grant R01-NS072221 (to A.E.). We thank Drs. Olga Garaschuk, Henner Koch, Snezana Maljevic, and Thomas Wuttke for helpful discussions on the manuscript; and Snezana Maljevic for managing and coordinating the mouse transfer and preparation of neuronal cultures.

The content of this article is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

Correspondence should be addressed to either of the following: Dr. Holger Lerche, Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie, Hertie Institut für Klinische Hirnforschung, Universität Tübingen, Hoppe-Seyler-Strasse 3, 72076 Tübingen, Germany, E-mail: holger.lerche@uni-tuebingen.de; or Massimo Mantegazza, Institute of Molecular and Cellular Pharmacology (IPMC), LabEx ICST, CNRS UMR7275 and University of Nice-Sophia Antipolis, 660 Route des Lucioles, 06560 Valbonne, France, E-mail: mantegazza@ipmc.cnrs.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0721-14.2014

Copyright © 2014 the authors 0270-6474/14/3414874-16\$15.00/0

familial hemiplegic migraine (Dichgans et al., 2005). DS is a severe epileptic encephalopathy with pharmacoresistant seizures and mental decline starting in the first or second year of life, whereas GEFS+ is characterized by milder febrile and afebrile seizures, which mostly can be controlled by antiepileptic drugs. For these two disorders, a genotype–phenotype relationship has been established: DS is mainly associated with deleterious *de novo* mutations that induce haploinsufficiency; whereas, GEFS+ is associated with missense mutations altering Na_v1.1 protein function in different ways (Zuberi et al., 2011).

Accordingly, gene-targeted *Scn1a* mouse models expressing truncated Na_v1.1 proteins have been used as models for DS. Indeed, many clinical features of DS are mimicked by those models, such as severe epilepsy, ataxia, and premature death. The first two studies of such mice (Yu et al., 2006; Ogiwara et al., 2007) revealed evidence for a reduced Na⁺ channel expression in interneurons as a possible epileptogenic mechanism.

Despite these results, the pathomechanisms underlying increased excitability in human epilepsies caused by point mutations in the *SCN1A* gene are not understood. It is still unknown (1) whether Na_v1.1 missense mutations cause a gain-of-function or loss-of-function with respect to neuronal activity, and in which neurons this effect is most prevalent; (2) in which neuronal compartments mutant channels exert their main pathophysiological effects; and (3) what impact such mutations have on complex network dynamics, which has been addressed only in a single study in Na_v1.1 knock-out mice (Liautard et al., 2013).

We set out to study the consequences of an epileptogenic *SCN1A* mutation on a cellular and network level, using acute brain slices of a knock-in mouse model. To identify the most important consequences on the neuronal dysfunction, we chose a mutation with subtle changes of channel function, p.R1648H (Alekov et al., 2000; Spanpanato et al., 2001; Lossin et al., 2002). This mutation has been previously identified in a large family with GEFS+ with 13 affected members exhibiting either febrile or afebrile generalized tonic–clonic or absence seizures (Escayg et al., 2000). Whereas homozygous (*Scn1a*^{RH/RH}) animals exhibit spontaneous generalized seizures and premature death from postnatal day 16 (P16) on, heterozygous (*Scn1a*^{RH/+}) animals present less frequent seizures and no change in life span, comparable to that in patients (Martin et al., 2010).

Our results reveal a widespread disinhibition with reduced intrinsic excitability of GABAergic inhibitory neurons, which is presumably due to impaired AP initiation in axon initial segments (AISs). These defects lead to an increased spontaneous neuronal network activity and can explain the generation of epileptic seizures.

Materials and Methods

Experimental animals. The mouse strain used in this study, carrying the R1648H mutation in Na_v1.1 on a C57BL/6 background, has been described previously (Martin et al., 2010). Wild-type (WT) littermates were used as controls. To label inhibitory neurons, we crossed the R1648H mouse strain with glutamate decarboxylase (GAD67)-GFP knock-in animals (same C57BL/6 background). In GAD67-GFP knock-in animals, GABAergic inhibitory neurons positive for parvalbumin, calretinin, and somatostatin are colocalized, with GFP with parvalbumin-positive cells being the most abundant in the neocortex (Tamamaki et al., 2003). Experiments were approved by the local Animal Care and Use Committee (Regierungspraesidium Tuebingen, Tuebingen, Germany; and Direction Départementale de la Protection des Populations Cote d'Azur, Nice, France).

Preparation and maintenance of slices. Thalamocortical slices from P14 to P20 mice were obtained with a Microm HM 650 V vibratome (Thermo

Fisher Scientific) using procedures previously described (Agmon and Connors, 1991). Horizontal hippocampal slices of the same age were used for recordings in the CA1 region. Animals were anesthetized with Sevoflurane (active ingredient Sevoflurane, Abbott Laboratories) or isoflurane (Axience) and decapitated. Brains were removed quickly and cut in ice-cold artificial CSF (ACSF) with the following composition (in mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 2.5 KCl, 7 MgCl₂, 2 CaCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 10 glucose, pH 7.4, equilibrated with 95% O₂/5% CO₂. Slices were stored to recover at 36°C for 1 h before recordings. For storage and recording, the following solution was used (in mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 2.5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 10 glucose, pH 7.4, equilibrated with 95% O₂/5% CO₂ (standard ACSF).

Immunohistochemistry. For morphological studies, patched cells were filled with 0.2% biocytin or Lucifer yellow. Slices were fixed for 1 h with 4% paraformaldehyde and incubated for 1 h in block medium (PBS with 6% normal goat serum and 0.6% Triton X-100) at room temperature. After washing steps performed with PBS, slices were incubated with a monoclonal antibody against GAD67 (Millipore Bioscience Research Reagents; 1:500 dilution) for 1 h at room temperature and at 4°C overnight. After washing steps performed with PBS, slices were incubated for 1 h at room temperature with secondary Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse antibodies (dilution 1:500; Invitrogen) and cy3-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch; dilution 1:1000) when neurons were filled with biocytin or with secondary Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse antibodies only (dilution 1:500; Invitrogen) when cells were filled with Lucifer yellow. Slices were stained with DAPI (Sigma-Aldrich; dilution 1:10,000) to identify the nuclei. After washing, slices were air dried and mounted with Mowiol (polyvinyl alcohol; Sigma-Aldrich) and visualized on an Axiophot 2 microscope (Zeiss).

Mutagenesis. Site-directed mutagenesis was performed to engineer the mutation into the human Na_v1.1 channel (GenBank sequence NM_006920.4 subcloned into the pCDM8 vector; Cestèle et al., 2008) using QuikChange (Agilent Technologies; primers are available upon request). The mutant cDNA was fully resequenced before use in experiments to confirm the introduced mutation and exclude any additional sequence alterations. The human Na⁺ channel subunits hβ₁ and hβ₂ in the pCLH vector were provided by GlaxoSmithKline. We exchanged the Hygromycin coding region in the vector with the sequence coding for either enhanced GFP (EGFP) or CD8 marker genes to obtain pCLH-hβ₁-EGFP and pCLH-hβ₂-CD8 (Liao et al., 2010).

Transfection and expression in tsA201 cells. Human tsA201 cells were cultured at 37°C, with 5% CO₂ humidified atmosphere, and were grown in DMEM (Invitrogen) plus 10% (v/v) fetal bovine serum. Transfections using Mirus TransIT-LT1 Transfection Reagent were performed for transient expression of wild-type or mutant Na⁺ channel α-subunits together with β₁- and β₂-subunits in tsA201 cells. For the coexpression, 2.4 μg of total DNA was transfected in a molar ratio of 1:1:1 as described previously (Liao et al., 2010). Cells positive for CD8 antigen and EGFP fluorescence were used for electrophysiological recordings.

Primary cell culture. Hippocampal and cortical neurons were isolated for multielectrode arrays (MEAs) or voltage-clamp recordings from embryonic day 17 (E17) R1648H or R1648H × GAD67 mouse brains, respectively. Pregnant females were killed using CO₂, and embryos were quickly taken out and decapitated. Using microsurgical dissection methods, the hippocampus or the cerebral cortex was isolated. Tissues were washed three times with 4°C magnesium- and calcium-free HBSS (PAA Laboratories GmbH) before treatment for 15 min with 2.5% trypsin. Subsequently, tissues were rinsed in DMEM with fetal bovine serum (Biochrom AG), L-glutamine (Invitrogen) and penicillin/streptomycin (Invitrogen) to block the trypsin reaction. Single neurons were obtained by mechanical dissociation using a pipette and a cell strainer (Becton Dickinson). For MEA recordings, 150,000 cells in 110 μl of solution were plated on the arrays. MEAs were coated with poly-D-lysine solution (5 mg poly-D-lysine in 100 ml of HBSS, filtered with a 0.45 μm filter) and 500 μl of DMEM with fetal bovine serum (Biochrom AG), L-glutamine (Invitrogen) and penicillin/streptomycin (Invitrogen). One hundred ten microliters of the cells in medium were plated on MEAs and allowed to settle down for 4 h. After that time, MEAs were flooded with Neurobasal cul-

ture medium (Invitrogen) supplemented with B27 (Invitrogen), glutamine, and penicillin/streptomycin.

For nucleated patch-clamp experiments, the dissociated neurons were plated on 13 mm coverslips in 24-well cell culture plates (Greiner Bio-One). The coverslips were coated with a poly-D-lysine solution (5 mg of poly-D-lysine in 100 ml of HBSS, filtered by using a 0.45 μ m filter) and 500 μ l of DMEM with fetal bovine serum (Biochrom AG), L-glutamine (Invitrogen), and penicillin/streptomycin (Invitrogen). After allowing the neurons to settle down for 5 h in a 37°C incubator with 5% CO_2 supply, the solution was replaced with Neurobasal culture medium (Invitrogen) supplemented with B27 (Invitrogen), glutamine, and penicillin/streptomycin.

Since homozygous animals with EGFP-labeled interneurons were not viable, we could use only *Scn1a*^{RH/+} animals with EGFP-labeled interneurons for our Na^+ current analysis.

Electrophysiological recordings. Whole-cell patch-clamp recordings of inhibitory and/or excitatory neurons within thalamus, cortex, or hippocampus were performed at 34°C using Axopatch 200B, Multiclamp 700B (Molecular Devices), or BVC 700A (Dagan) amplifiers; a DigiData 1420 digitizer (Molecular Devices); and pClamp 10.3 software (Molecular Devices). Slices were positioned in a submerged-type recording chamber (Luigs & Neumann or Warner Instruments), continuously superfused with ACSF, and visualized with an Axioskop 2FS (Zeiss) or an Eclipse FN1 (Nikon) microscope. Pipettes were pulled from borosilicate glass (Science Products GmbH) using a Sutter P97 Puller (Sutter Instruments), with resistances of 3–5 M Ω . For current-clamp experiments, cells were held at -70 mV, and the patch pipette solution contained the following (in mM): 5 KCl, 4 ATP-Mg, 10 phosphocreatine, 0.3 GTP-Na, 10 HEPES, 125 K-gluconate, 2 MgCl₂, 10 EGTA, and 0.2% biocytin or Lucifer yellow with a final pH of 7.2 and an osmolarity of 290 mOsm/kg. To record spontaneous and miniature IPSCs or tonic GABA_A current, the AMPA and kainate receptor antagonist DNQX (10 μ M; Sigma-Aldrich) and the NMDA receptor antagonist APV (30 μ M) were added to the standard ACSF; patch pipettes contained the following (in mM): 105 CsCl, 35 CsOH, 10 HEPES, 10 EGTA, 10 phosphocreatine, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Na, 14 D-mannitol, 0.2% biocytin, or Lucifer yellow. Membrane voltage was clamped to -70 mV, and IPSCs were recorded over 5 min epochs. For current and voltage-clamp experiments, the sampling rate was 100 kHz and the data were low-pass filtered at 30 kHz. Series resistance (<20 M Ω) was monitored during the experiment. Cells showing unstable series resistance or resting membrane potential were discarded.

Nucleated patch recordings were performed using an Axopatch 200B amplifier (in primary cortical cultures) and a multiclamp 700B amplifier (in brain slices), a DigiData 1420 digitizer, and pClamp 10 data acquisition software (Molecular Devices), as has been described previously (Liao et al., 2010; Lauxmann et al., 2013). For whole-cell patch-clamp recordings of tsA201 cells, an Axopatch 200B amplifier, a DigiData 1320A digitizer, and pCLAMP 8 data acquisition software were used (Molecular Devices), and cells were visualized with an inverted microscope (Axio Vert.A1, Zeiss). Leakage and capacitive currents were automatically subtracted using a prepulse protocol ($-P_4$). Currents were filtered at 5 kHz and digitized at 20 kHz. All recordings were performed at room temperature of 21–23°C. Borosilicate glass pipettes were fire polished with a final tip resistance of 1–2 M Ω when filled with internal recording solution.

The extracellular solution used for nucleated patches of primary cortical cultures contained the following (in mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 20 tetraethylammonium (TEA)-Cl, 5 CsCl, 0.1 CdCl₂, and 10 HEPES; pH was adjusted to 7.3 with CsOH. Pipettes were filled with an intracellular solution containing the following (in mM): 140 CsF, 10 NaCl, 1 EGTA, and 10 HEPES, with pH was adjusted to 7.3 with CsOH. The ACSF for recording Na^+ currents in nucleated patches in acute slices contained the following (in mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 25 glucose, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. TEA (20 mM) was added to block voltage-gated K⁺ channels. Pipettes were filled with a Cs⁺-rich internal solution, containing the following (in mM): 140 CsCl, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 2 ATP-Na₂, and 10 HEPES, with pH adjusted to 7.3 with CsOH.

For recording the persistent sodium current (I_{NaP}) in hippocampal and nucleus reticularis of the thalamus (nRt) inhibitory neurons in acute slices, the ACSF contained the following (in mM): 50 NaCl, 90 TEA-Cl, 10 HEPES-free acid, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 3.5 KCl, 3 CsCl, 0.2 CdCl₂, 4 4-AP, and 25 glucose. pH was adjusted to 7.4 using NaOH. The intracellular solution contained the following (in mM): 110 CsF, 10 HEPES-Na, 11 EGTA, 2 MgCl₂, 0.5 GTP-Na, and 2 ATP-Na₂. pH was adjusted to 7.3 with CsOH. For eliciting persistent sodium currents, voltage ramps from -80 to 20 mV with a velocity of 25 mV/s were used. In each case, currents were recorded in ACSF and in the presence of TTX to subtract remaining potassium or calcium currents.

Na^+ currents of 1–12 nA were recorded from transfected tsA201 cells at least 10 min after establishing the whole-cell configuration. The pipette solution contained the following (in mM): 105 CsF, 35 NaCl, 10 EGTA, and 10 HEPES, pH 7.4. The bath solution contained the following (in mM): 150 NaCl, 2 KCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 10 HEPES, pH 7.4.

Local extracellular field potentials were recorded using glass electrodes in slices continuously perfused with ACSF bubbled with 95% O₂/5% CO₂ and maintained in an interface chamber at 34°C (Campden Instruments) with Multiclamp 700B or DAGAN EX4–400 amplifiers. Electrical stimulations were applied with bipolar electrodes (FHC Inc.), a SIU91A isolator (Cygnus Technologies), pCLAMP software, and a DigiData 1420 digitizer, as in Liautard et al. (2013). Sampling rate was 10 kHz and data were low-pass filtered at 4 kHz. Recording electrodes were positioned in the S1 cortex [layer IV (LIV) and layer V (LV)] and in the thalamus [nRt and ventrobasal part of the thalamus (VB)]. Paired-pulse stimulations of the VB, at the intensity eliciting the maximal LIV response, consisted of the application of two pulse stimuli with increasing interpulse interval (IPI); analysis was performed on the monosynaptic response (Agmon and Connors, 1991). For coastline analysis, the coastline index (Korn et al., 1987) was the length of the line describing the monosynaptic responses, which was calculated by applying Pythagoras' theorem to each pair of data points, computed with Origin version 8.5 software (OriginLab) as follows:

$$\text{Coastline index} = \sum_i \sqrt{(x_i - x_{i+1})^2 + (y_i - y_{i+1})^2}$$

with x_i and y_i being the time (in milliseconds) and amplitude (in millivolts), respectively, of each data point (i).

The paired-pulse ratio was calculated by dividing the amplitude, or the coastline index, of the second monosynaptic response in the pair by the amplitude, or the coastline index, of the first one. For displaying high-frequency oscillation (HFO) traces, data were bandpass filtered off-line at 40–200 and 200–600 Hz with pClamp Bessel eight-pole filters. For analysis of HFOs, we also subtracted the contribution of the noise to the filtered traces: for both 40–200 and 200–600 Hz filters, we computed the absolute area of the oscillations with Origin version 8.5 software and subtracted the absolute area of an eventless period of the same duration immediately preceding the activity under analysis. To take into account the possible bias in HFO areas induced by the amplitude of the spontaneous activity (HFOs may appear larger in slices of *Scn1a*^{RH/+} animals just because amplitudes of spontaneous activities are larger), we also compared normalized noise-subtracted HFO absolute areas, dividing the absolute area of the HFO by the absolute area of the corresponding spontaneous activity (0.1 Hz–1 kHz filtered). For some recordings, results were confirmed obtaining HFOs by filtering traces (40–200 and 200–600 Hz) with a fast Fourier transform bandpass filter (Origin version 8.5 software).

Voltage-clamp protocols and data analysis for transient Na^+ currents recorded from neurons and tsA201 cells. For the voltage-clamp protocols used, recorded currents from nucleated patches were averaged up to 10 times to obtain homogeneous results.

The activation curve (conductance–voltage relationship) was derived from the current–voltage relationship curves obtained by plotting the peak current over various step depolarizations [7.5 mV steps from the holding potential of -90 – -140 mV (neurons/tsA-cells)] according to

$$g(V) = \frac{I}{(V - V_{rev})}$$

with g being the conductance, I the recorded peak current at test potential V , and V_{rev} the apparent observed Na⁺ reversal potential.

The voltage dependence of activation was fit with the following Boltzmann function:

$$g(V) = \frac{g_{max}}{\{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k_v]\}}$$

with g_{max} being the maximal conductance, $V_{1/2}$ the voltage of half-maximal activation, and k_v a slope factor. Steady-state inactivation was determined using 300 ms conditioning pulses to various potentials followed by the test pulse to -20 mV at which the peak current reflected the percentage of non-inactivated channels. A standard Boltzmann function was fit to the inactivation curves:

$$I(V) = \frac{I_{max}}{\{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k_v]\}}$$

with I_{max} being the maximal current amplitude.

Recovery from fast inactivation was recorded from cells depolarized to -20 mV for 100 ms to inactivate all Na⁺ channels and then repolarized to $-90/-140$ mV (neurons/tsA-cells) recovery potential for increasing duration. A second-order exponential function with an initial delay was best fit to the time course of recovery from inactivation. The faster time constant with the much larger relative amplitude, τ_{rec} , is shown for data evaluation in Figure 2G.

Entry into and steady-state slow inactivation for tSA cells were characterized using cumulative protocols (Alekov et al., 2000). For steady-state slow inactivation, 30 s conditioning pulses starting at a holding potential of -140 mV in 10 mV steps up to 10 mV were used. Each of these steps was followed by a 20 ms hyperpolarization to -140 mV to let channels recover from fast inactivation and a test pulse to -20 mV. Curves were fitted to a standard Boltzmann function as for fast inactivation. To measure the entry into slow inactivation, cells were held at -140 mV and depolarized to 0 mV for increasing durations, repolarized for 100 ms to -100 mV to let the channels recover from fast inactivation, and then depolarized again to -10 mV to determine the fraction of slow inactivated channels. The time course of slow inactivation was best fitted by a first-order exponential function.

MEAs. MEAs were used to record activity from primary hippocampal neurons prepared from E17 mice after 3 weeks in culture. MEAs had a square grid of 60 planar Ti/TiN electrodes of 30 μ m diameter and 200 μ m spacing. Electrodes had an input impedance of 30–50 k Ω according to the specifications of the manufacturer (Multi Channel Systems). Signals from all 60 electrodes were simultaneously sampled at 25 kHz, visualized, and stored using the standard software MC_Rack provided by Multi Channel Systems. Spike detection was performed off-line by the SPANNER software suite (RESULT Medical; see also Illes et al., 2009). Synchronous network activity was analyzed by population burst (PB) detection using custom-built Matlab software.

Spikes from all electrodes were aggregated in nonoverlapping 5 ms bins and smoothed by a Gaussian kernel with a 100 ms SD to obtain the population firing rate (PFR; Schock et al., 2012). PB detection was performed in a three-step procedure. First, PB candidate intervals were identified whenever the PFR exceeded the slowly varying 1 s firing rate average. In a second step, the actual PBs from these candidate intervals were selected, if (1) their peak firing rate exceeded 3 SDs of the recording PFR, (2) their peak firing rate exceeded 10% of the average of the top five peaks, and (3) at least three electrodes contributed. Finally, neighboring PBs were merged if they were <200 ms apart. PB onset and termination were defined by the actual spike time stamps of the first and last spike in the resulting time interval. In this way, synchronous network activity on time scales of tens to several hundreds of milliseconds could reliably be captured. The peak firing rate (i.e., the maximum PFR within a PB interval, reported in spikes per second) and the number of PBs per minute were analyzed. For the quantification of firing synchrony across pairs of electrodes, spikes were collected in 10-ms-wide bins and subsequently dichotomized to either zero spikes or at least one spike. Consequently, both electrodes were active during a time bin ("coincident bin"), only one electrode was active, or both were silent. Cohen's κ statistic then

captures the proportion of observed coincident bins exceeding the chance expected proportion of coincidences (Woolson and Clarke, 2002). Similar to Pearson's correlation coefficient, κ values lie in the range -1 to $+1$. The average κ value of all electrode pairs with a firing rate of at least 30 spikes/min was calculated as a measure of the overall synchrony of a recording.

Ca²⁺ dye loading and imaging. An initial 5 mM OGB-1-AM (Oregon-Green 488 BAPTA-1, cell permeant; Invitrogen) stock solution dissolved in 20% Pluronic acid, and DMSO was mixed properly and diluted with HEPES to obtain the final concentration of 8 mM. The final solution was filtered and backloaded into a pipette for pressure injection. The pipette was placed in stratum oriens of the hippocampal CA1 region to load the slice with the Ca²⁺ dye. To image Ca²⁺ transients, slices were incubated in ACSF at 36°C for 30 min to ensure dye uptake. A custom-made selective planar illumination microscope was used for Ca²⁺ imaging (modified after Holekamp et al., 2008).

As an excitation light source, a 488 nm optically pumped semiconductor laser (Sapphire 488 LP, Coherent) with a maximal output power of 20 mW was used. The laser intensity in the light sheet focus was $\sim 3\%$ of the intensity emitted by the laser. To image the illuminated tissue a 16 \times water-immersion objective (CFI75 LWD, Nikon) was used mounted to a piezoelectrical objective positioning system (Mipos 500, Piezo Sytems). To filter the wavelength emitted by the calcium dye, a 536/40 emission filter (536/40, BrightLine) was used, and the filtered picture was focused with a 0.5 \times tube lens (InfiniTube FM-100, Infinity Photo-Optical Company). Images were recorded using a 1 megapixel electron multiplying charge-coupled device camera (iXon EM+, Andor).

ROIs were detected using a Gauss-filtering- and contour-filtering-based cell detection algorithm written in MatLab (Allène et al., 2008). Ca²⁺ traces were recorded as changes in mean pixel intensity in each ROI over 20 min. Ca²⁺ events were detected using a custom-made detection algorithm written in MatLab. Background was subtracted and photo bleaching was removed by dividing a double exponential function. Traces were high-pass filtered by subtracting the low-pass-filtered signal using a Butterworth low-pass filter. The signal over threshold was depicted as a possible event and confirmed if the unfiltered event showed an exponential decay with a time constant 500 ± 200 ms (Grewe et al., 2010). The maximum of the second derivative of the Ca²⁺ event was chosen as the time point for the underlying cell activity (Henze et al., 2000). Readout data were processed using Origin (version 6.1, OriginLab).

Data and statistical analysis. Traces were displayed off-line with the Clampfit software pClamp version 10.0 (Molecular Devices). Graphics were generated using Excel (Microsoft) and Origin (version 6.1 or 8.5), statistics were performed using SigmaStat 3.1 (STATCON). All data were tested for normal distribution. For statistical evaluation, the following tests were used as indicated in the respective figure legends or in text: (1) Mann-Whitney rank-sum test for unpaired datasets of WT and *Scn1a*^{RE/+} animals; (2) Wilcoxon signed-rank nonparametric test for paired datasets (e.g., before and after the application of drugs); (3) ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis test) with Dunn's *post hoc* test for comparing more than two groups; or (4) *t* test or one-way ANOVA when two datasets of unpaired groups were normally distributed. All data are shown as the means \pm SEM. Box-and-whisker plots show medians (lines), means (square), lower and upper quartiles, minimums, and maximums. Data are shown as the mean \pm SEM; n gives the number of cells or activities. For all statistical tests, significance with respect to the control is indicated on the figures using the following symbols: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Results

Epileptic phenotypes in patients carrying *SCN1A* mutations including p.R1648H are variable, including febrile, generalized tonic-clonic and absence seizures. This indicates that the human mutation functionally impairs different neuronal systems, potentially including neocortical, allocortical, and thalamic structures. Therefore, we performed a comprehensive electrophysiological analysis examining the intrinsic firing properties of inhibitory and excitatory neurons, as well as synaptic and network activity in

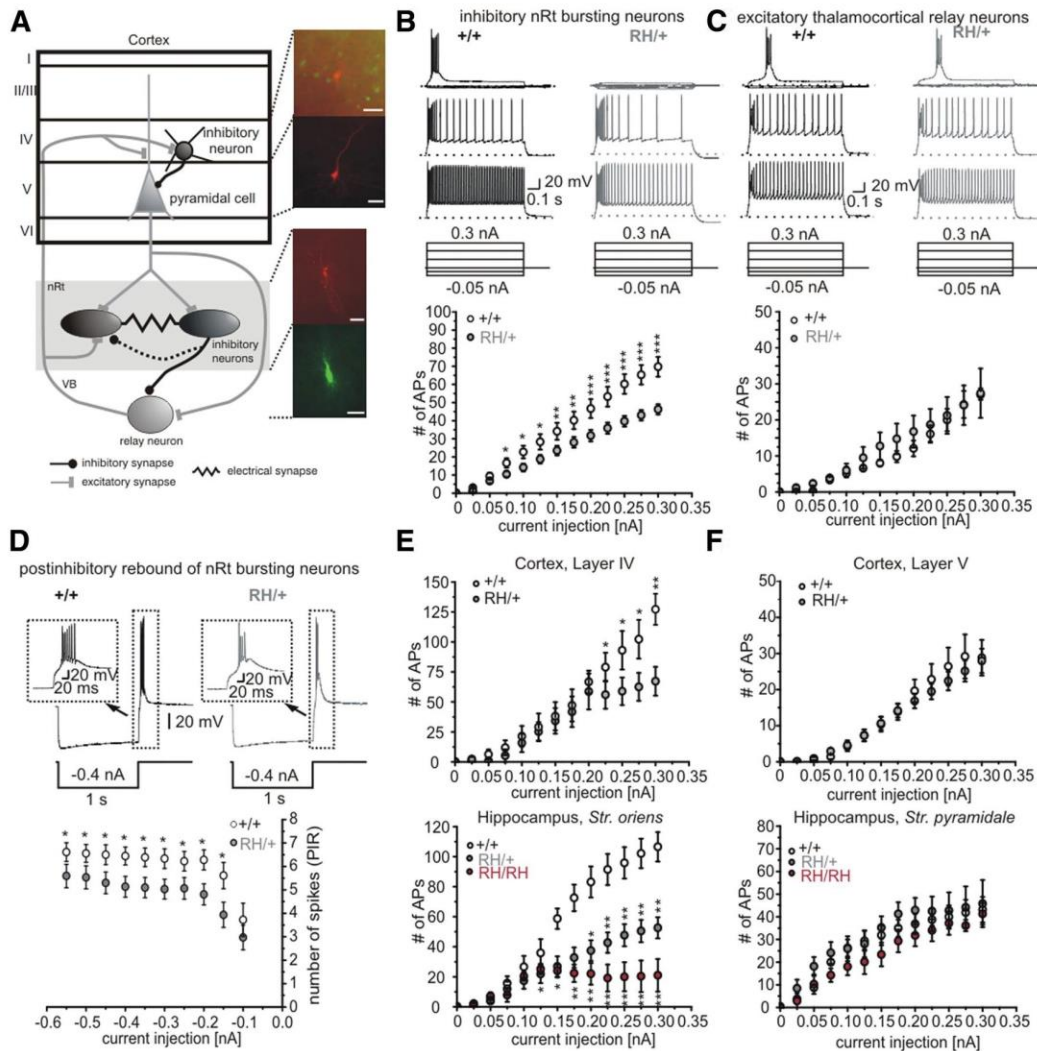


Figure 1. Firing behavior of neurons within thalamocortical and hippocampal network. **A**, Schematic of thalamocortical circuit with reciprocal interconnections between thalamus and cortex. Thalamocortical relay neurons receive excitatory input and subsequently activate cortical pyramidal neurons and adjacent inhibitory GABAergic neurons. Cortical pyramidal neurons are reciprocally connected to thalamic relay neurons and excite GABAergic neurons in the nRt, which in turn inhibit each other as well as relay neurons. Right, Pictures of recorded cells in the different areas filled with Lucifer yellow or biocytin (red). Scale bars, 100 μ m. **B**, Top, Representative whole-cell current-clamp recordings of AP series in GABAergic nRt neurons of WT (+/+, left) and heterozygous (RH/+, right) animals. Original recordings, top, Voltage traces upon injection of -0.05 , -0.025 , 0 , and 0.1 nA; middle: 0.2 nA, bottom: 0.3 nA (current-clamp protocol shown below). Dashed lines show holding potential of -70 mV. All current steps are given in plots below showing the number of APs plotted vs current injection. Bottom, Number of APs is plotted vs current injection. WT: $n = 23$ cells from 14 animals; *Scn1a*^{RH/+}: $n = 37$ cells from 22 animals. **C**, Top, Whole-cell current-clamp recordings of excitatory relay neurons of WT (left) and *Scn1a*^{RH/+} (right) animals. Original recordings are selected as in **A**. Bottom, Number of APs is plotted vs current injection. WT mice: $n = 12$ cells from six animals; *Scn1a*^{RH/+} mice: $n = 12$ cells from seven animals. **D**, Top, Whole-cell current-clamp recordings of the postinhibitory rebound in nRt neurons of WT (left) and heterozygous (right) animals during and after -400 pA current injection. Insets show amplifications highlighted with dashed boxes. Number of APs during the postinhibitory rebound (PIR) plotted vs different preceding hyperpolarizing current injections. **E**, Number of APs recorded in cortical layer IV (top) and hippocampal (CA1 region, stratum oriens; bottom) FS inhibitory neurons plotted vs current injections. Cortex: WT mice, $n = 7$ cells from five animals; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 9$ cells from six animals. Hippocampus: WT mice, $n = 7$ cells from three animals; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 11$ cells from six animals; *Scn1a*^{RH/RH} mice, $n = 6$ cells from three animals. **F**, Number of APs recorded in cortical layer V (top) and hippocampal (CA1 region, stratum pyramidale; bottom) pyramidal cells plotted vs current injections. Cortex: WT mice, $n = 17$ cells from 11 animals; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 26$ cells from 10 animals. Hippocampus: WT mice, $n = 15$ cells from six animals; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 14$ cells from seven animals; *Scn1a*^{RH/RH} mice, $n = 8$ cells from three animals. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, Mann–Whitney test and ANOVA on ranks (hippocampus). Data are shown as means \pm SEM.

thalamus, cortex, and hippocampus. We used acute brain slices of WT and mainly heterozygous mice (*Scn1a*^{RH/+}), since they should best mimic the situation in patients. To better understand Na^+ channel dysfunction, we also used homozygous *Scn1a*^{RH/RH} mice in some conditions. Since seizures in GEFS+ patients with *SCN1A* mutations start in early childhood (Weber and Lerche, 2008), we studied the effects of the mutation in slices of animals between P14 and P20.

Intrinsic firing properties of inhibitory and excitatory thalamic neurons

In the thalamocortical network (Fig. 1A), which is involved in the generation of generalized seizures (Steriade, 2005; Beenhakker and Huguenard, 2009), we studied the neurons that were mainly involved: cortical LIV and LV inhibitory and excitatory neurons, inhibitory neurons within the nRt, as well as thalamocortical relay neurons in the VB of P14–P20 mice.

Table 1. Membrane properties of different neurons recorded in brain slices of WT and mutant animals

Animals	V_m (mV)	R_{in} (M Ω)	AP threshold for eliciting 1 AP (mV)	1 AP width (ms)	Rheobase (pA)*	Cells (n)
<i>Nucleus reticularis</i> , burster						
WT	-68.6 ± 3.5	181.4 ± 14.9	-50.1 ± 4.1	0.65 ± 0.03	47.6 ± 4.5	23
<i>Scn1a</i> ^{RH/+}	-69.6 ± 3.6	156.8 ± 13.0	-49.1 ± 2.5	0.61 ± 0.02	54.1 ± 4.3	37
<i>Scn1a</i> ^{RH/RH}	-69.9 ± 0.8	225.5 ± 17.9	-52.0 ± 0.8	0.64 ± 0.02	57.5 ± 5.8	10
<i>Nucleus reticularis</i> , non-burster						
WT	-72.3 ± 1.7	303.0 ± 47.9	-53.1 ± 0.9	1.04 ± 0.07	59.3 ± 7.4	7
<i>Scn1a</i> ^{RH/+}	-72.3 ± 1.5	306.2 ± 69.5	-55.0 ± 5.3	1.02 ± 0.08	79.3 ± 10.9	7
VB, relay neuron						
WT	-72.1 ± 1.0	104.5 ± 4.1	-57.3 ± 1.8	1.03 ± 0.02	97.7 ± 8.6	11
<i>Scn1a</i> ^{RH/+}	-70.9 ± 1.8	134.75 ± 16.2	-55.3 ± 1.3	1.01 ± 0.03	87.5 ± 11.7	13
<i>Scn1a</i> ^{RH/RH}	-69.3 ± 1.4	153.82 ± 17.48	-52.6 ± 1.0	1.02 ± 0.04	87.5 ± 12.5	6
Cortex, inhibitory neurons						
WT	-70.1 ± 1.4	200.1 ± 16.8	-54.1 ± 1.8	0.44 ± 0.04	92.9 ± 13.0	7
<i>Scn1a</i> ^{RH/+}	-69.9 ± 1.5	196.7 ± 14.6	-52.4 ± 1.3	0.54 ± 0.03	105.0 ± 16.2	9
Cortex, pyramidal cells						
WT	-72.9 ± 1.1	140.7 ± 11.2	-54.7 ± 1.8	1.02 ± 0.05	107.8 ± 9.9	17
<i>Scn1a</i> ^{RH/+}	-74.1 ± 1.0	152.0 ± 8.9	-57.2 ± 1.5	1.03 ± 0.04	101.0 ± 7.8	26
Hippocampus, <i>Stratum oriens</i>						
WT	-74.5 ± 5.1	174.9 ± 11.4	-54.4 ± 1.0	0.57 ± 0.07	50.0 ± 9.5	7
<i>Scn1a</i> ^{RH/+}	-73.4 ± 4.8	163.7 ± 16.9	-53.1 ± 1.9	0.57 ± 0.05	79.6 ± 16.8	11
<i>Scn1a</i> ^{RH/RH}	-69.3 ± 1.1	206.4 ± 14.2	-52.8 ± 1.1	0.58 ± 0.03	64.2 ± 7.7	6
Hippocampus, <i>Stratum pyramidale</i>						
WT	-74.8 ± 1.2	226.2 ± 14.0	-53.4 ± 1.2	1.04 ± 0.02	50.0 ± 5.9	15
<i>Scn1a</i> ^{RH/+}	-71.0 ± 1.2	190.8 ± 19.1	-55.8 ± 1.6	1.06 ± 0.04	55.6 ± 12.3	14
<i>Scn1a</i> ^{RH/RH}	-70.7 ± 2.1	183.4 ± 16.9	-54.0 ± 1.7	1.08 ± 0.02	43.8 ± 6.3	8

Data are presented as means \pm SEM; Mann–Whitney rank-sum test and ANOVA on ranks with Dunn's *post hoc* test.

*Current injection of 800 ms. V_m , resting membrane potential; R_{in} , input resistance.

In the nRt, we found two types of inhibitory neurons. Most of them displayed an initial burst discharge of APs as a response to current injections (Fig. 1B). Others, predominantly in the dorsal part of the nRt, showed only tonic activity (Contreras et al., 1992; Lee et al., 2007). Firing was recorded upon different current injections. Both bursting and tonically active nRt neurons of heterozygous animals showed significantly fewer APs in response to the same current injections compared with WT littermates (number of spikes during 250 pA current injection: bursting neurons: WT mice, 47 ± 5 , $n = 23$; *Scn1a*^{RH/+} mice, 32 ± 3 , $n = 37$; $p < 0.001$, Mann–Whitney test; Fig. 1B; tonically active neurons: WT mice, 87 ± 13 , $n = 7$; *Scn1a*^{RH/+} mice, 53 ± 5 , $n = 7$; $p < 0.01$, Mann–Whitney test).

A characteristic feature of inhibitory nRt cells is a postinhibitory rebound after a hyperpolarization characterized by a low-threshold calcium spike and a burst of APs (Fig. 1D, top; Contreras et al., 1992; Llinás and Steriade, 2006). Neurons from heterozygous animals showed a significantly reduced number of APs within the rebound burst confirming their reduced excitability, when compared with WT mice (Fig. 1D).

In contrast, the firing rates of excitatory thalamocortical relay neurons within the thalamic VB were not significantly different between heterozygous and WT animals (number of spikes during 250 pA current injection: WT mice, 20.0 ± 3.1 , $n = 11$; *Scn1a*^{RH/+} mice, 21.5 ± 5.1 , $n = 13$); $p = NS$, Mann–Whitney test; Fig. 1C). These findings indicate that the mutation selectively influences firing of thalamic inhibitory, but not of excitatory neurons.

Intrinsic firing properties of cortical and hippocampal inhibitory and excitatory neurons

We next recorded from cortical neurons in the S1 region. GABAergic neurons were labeled by crossing R1648H knock-in mice with a line expressing EGFP in interneurons (Tamamaki et al., 2003). Similar to the thalamus, LIV fast-spiking (FS) inhibi-

tory neurons, but not LV pyramidal cells, fired fewer APs in response to current injections in *Scn1a*^{RH/+} mice compared with WT mice, as shown in Figure 1, E and F, top (number of spikes during 250 pA current injection: interneurons: WT mice, 93 ± 16 , $n = 7$; *Scn1a*^{RH/+} mice, 59 ± 11 , $n = 9$; $p < 0.05$; pyramidal cells: WT mice, 26 ± 5 , $n = 17$; *Scn1a*^{RH/+} mice, 22 ± 3 , $n = 26$; $p = NS$, Mann–Whitney test).

For recordings in the hippocampal CA1 region, we used WT, *Scn1a*^{RH/+}, and also homozygous *Scn1a*^{RH/RH} mice, since we later also used hippocampal neurons for Na^+ current recordings for which homozygous animals were important (see below). Interneurons and pyramidal neurons were identified by morphology and localization, and were confirmed by biocytin or Lucifer yellow labeling. For analysis, we used only FS neurons with homogenous electrophysiological characteristics (AP width, < 0.6 ms; APs are followed by a large afterhyperpolarization) as well as morphological properties (located in the stratum oriens, close to the stratum pyramidale with main projections in the pyramidal cell layer), which were presumed to represent basket cells. We did not include interneurons showing regular or stuttering spiking. As GABAergic neurons in thalamus and cortex, FS interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 region showed reduced firing for mutant mice (number of spikes during 250 pA current injection: WT mice, 96 ± 10 , $n = 7$; *Scn1a*^{RH/+} mice, 48 ± 7 , $n = 11$; $p < 0.001$), which was more pronounced for homozygous animals (*Scn1a*^{RH/RH} mice, 20 ± 10 , $n = 6$; $p < 0.001$, ANOVA on ranks; Fig. 1E, bottom). Excitatory pyramidal cells in CA1 stratum pyramidale did not show significant differences in firing properties (WT mice, 40 ± 5 , $n = 15$; *Scn1a*^{RH/+} mice, 43 ± 8 , $n = 14$; *Scn1a*^{RH/RH} mice, 35 ± 5 , $n = 8$; $p = NS$, ANOVA on ranks; Fig. 1F, bottom). We also examined the passive membrane properties in the neuron types discussed above showing no significant differences between WT and mutant animals in any type of neuron (Table 1).

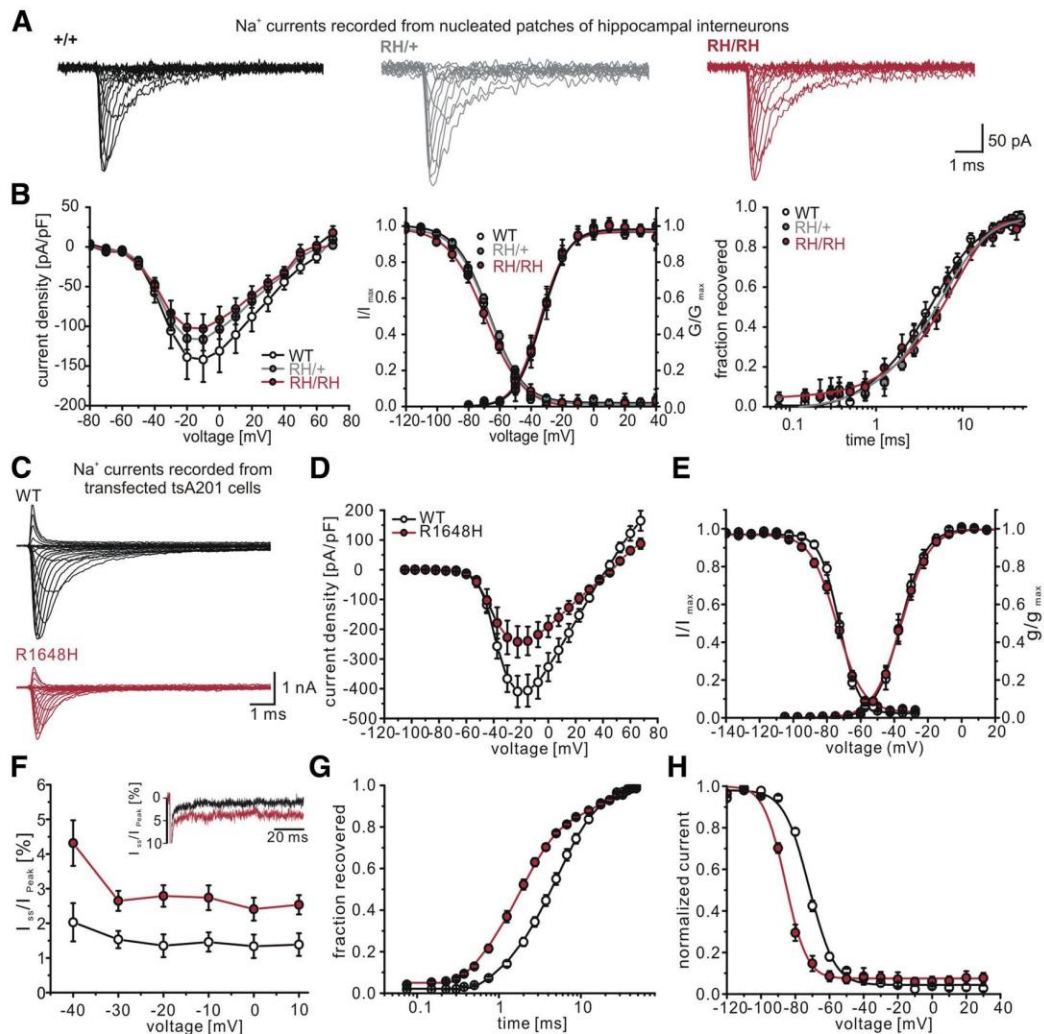


Figure 2. Transient Na^+ currents of hippocampal inhibitory neurons recorded in acute brain slices and of transfected tsA201 cells. **A**, Original recordings of Na^+ currents from nucleated patches derived from inhibitory neurons in CA1 stratum oriens of WT (left), heterozygous (middle), and homozygous (right) animals. **B**, Gating parameters of Na^+ currents as recorded in **A**. Left, Current density; middle, steady-state activation and fast inactivation curves; right, recovery from fast inactivation. Voltage-clamp protocols and data evaluation procedures are given in the Materials and Methods section. Data are shown as means \pm SEM. There were no significant differences among the three genotypes. **C**, Representative whole-cell patch-clamp recordings of tsA cells transfected with *SCN7A*-WT DNA (top) and *SCN7A*-R1648H DNA (bottom), respectively. **D**, Current density–voltage plots for h $Na_v1.1$ -WT and R1648H. See also Table 2. **E**, Mean voltage dependence of steady-state Na^+ channel activation and fast inactivation with lines revealing Boltzmann functions. **F**, Voltage dependence of the persistent currents showing a largely increased persistent current for the R1648H mutation. Current amplitudes were recorded at the end of a 70 ms depolarization to 0 mV and are normalized to the peak amplitude (steady-state current/initial peak current). **G**, Time course of recovery from fast inactivation determined at 100 mV revealing acceleration for R1648H mutant channels. Lines represent fits of exponential functions. **H**, Mean voltage dependence of steady-state slow inactivation fitted to a standard Boltzmann function (lines): $V_{1/2} = -71.8 \pm 0.7$ mV for WT ($n = 7$) vs $V_{1/2} = -85.8 \pm 0.9$ mV for R1648H ($n = 5$); $p < 0.05$, Student's t test.

In summary, these results demonstrate a widespread dysfunction of inhibitory, but not of excitatory neurons with respect to AP firing. The reduced firing indicated a loss-of-function of mutant Na^+ channels expressed in interneurons.

Properties of somatic fast Na^+ currents in inhibitory neurons

Na^+ currents from native neurons are ideally recorded from nucleated patches, which permit recording from unequivocally identified neurons, and allow adequate voltage control (Martina and Jonas, 1997). Nucleated patches were obtained from inhibitory neurons of stratum oriens and primary cortical cultures. Recorded Na^+ currents had amplitudes of 100–400 pA. There were no significant differences between heterozygous and WT animals, both in

interneurons in stratum oriens (Fig. 2A,B; Table 2) and primary cortical cultures (Table 2), although slight alterations in a direction similar to that recorded using recombinant human channels could be observed (see below; reduced current density and decreased slope of the steady-state fast inactivation curve; Fig. 2).

Thus, we re-examined the properties of the R1648H mutation in a heterologous expression system. In tsA201 cells, the R1648H mutation in h $Na_v1.1$ showed results similar to those reported previously (Fig. 2C–H; Table 2; Alekov et al., 2000; Spanpanato et al., 2001; Lossin et al., 2002). Compared with the WT mice, mutant channels showed defects in fast inactivation with decreased slope and slight shift to more hyperpolarized potentials of the fast steady-state inactivation curve, accelerated recovery from fast inac-

Table 2. Activation and inactivation of Na^+ currents in nucleated patches of neurons and whole cell recordings of tsA cells

	Current-density (pA/pF)	Steady-state activation			Steady-state inactivation			T_{rec} at -100 mV
		$V_{1/2}$ (mV)	k_V	n	$V_{1/2}$ (mV)	k_V	n	
Nucleated patches of inhibitory neurons in primary cortical neurons								
WT	-684.6 ± 93.2	-29.6 ± 0.5	-6.7 ± 0.1	22	-63.1 ± 0.8	5.2 ± 0.2	22	4.1 ± 0.4
<i>Scn1a</i> ^{RH/+}	-757.4 ± 142.1	-29.4 ± 0.8	-6.5 ± 0.2	20	-63.6 ± 1.1	5.6 ± 0.4	20	4.4 ± 0.5
Nucleated patches of inhibitory CA1 neurons in acute slices								
WT	-143.3 ± 29.5	-33.0 ± 1.4	-6.8 ± 0.2	10	-68 ± 1.1	9.1 ± 0.4	9	3.9 ± 1.0
<i>Scn1a</i> ^{RH/+}	-116.9 ± 12.0	-33.3 ± 1.1	-6.4 ± 0.4	15	-66.6 ± 1.4	9.6 ± 0.4	15	5.1 ± 1.3
<i>Scn1a</i> ^{RH/RH}	-106.7 ± 17.5	-34.4 ± 1.1	-6.6 ± 0.4	9	-71.0 ± 1.1	11.8 ± 1.5	8	6.6 ± 1.6
Whole cell patch-clamp recordings of transfected tsA cells								
WT	-421.8 ± 54.6	-35.1 ± 2.2	6.2 ± 0.4	9	-73.0 ± 1.3	4.6 ± 0.1	8	5.3 ± 0.6
R1648H	$-251.2 \pm 53.5^*$	-34.4 ± 1.7	7.1 ± 0.3	11	-73.6 ± 0.8	$7.1 \pm 0.5^*$	11	$1.8 \pm 0.2^*$

Data are presented as means \pm SEM. n , Number of recorded neurons. T_{rec} , time constant of recovery from fast inactivation.

* $p < 0.001$, WT vs R1648H. Mann–Whitney rank-sum test for cases with two groups compared (WT vs *Scn1a*^{RH/+} or R1648H mutation) and ANOVA on ranks with Dunn's *post hoc* test for comparing WT, *Scn1a*^{RH/+}, and *Scn1a*^{RH/RH} mice.

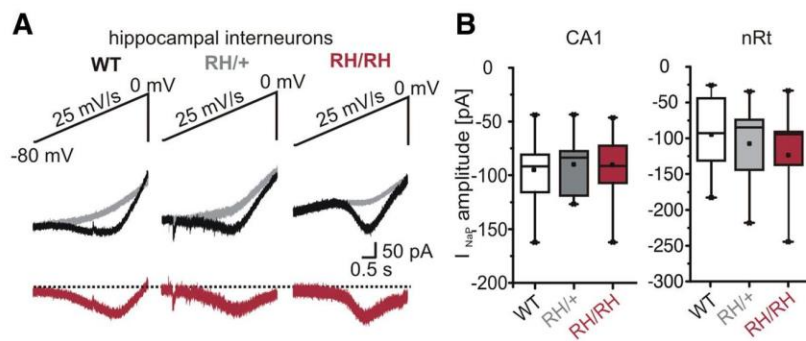


Figure 3. Persistent Na^+ currents recorded in inhibitory nRt and hippocampal neurons. **A**, Representative whole-cell patch-clamp recordings of persistent currents of hippocampal FS neurons elicited by voltage ramps from -80 to 0 mV. **B**, Box plots of peak persistent currents recorded in inhibitory hippocampal (left) and nRt neurons (right). The peak I_{NaP} does not significantly differ between WT and mutant animals. ANOVA on ranks with Dunn's *post hoc* test.

tivation (Table 2), and increased persistent current (Fig. 2F; see below). Additional findings were a reduced current density and a large hyperpolarizing shift in steady-state slow inactivation (Fig. 2H; Table 2).

Properties of persistent Na^+ currents in interneurons

An important functional consequence of the R1648H mutation in the human $Na_v1.1$ channel described in tsA201 cells (Lossin et al., 2002) was an increased persistent Na^+ current, which we could confirm using a different clone of the human $Na_v1.1$ channel (Fig. 2F; Rusconi et al., 2007), but which was not detected in studies using the human skeletal muscle channel $hNa_v1.4$ in tsA201 cells (Alekov et al., 2000), the rat $Na_v1.1$ channel in *Xenopus* oocytes (Spampanato et al., 2001), or hippocampal neurons dissociated from transgenic mice expressing R1648H in mouse $Na_v1.1$ (Tang et al., 2009). To assess the persistent current in native neurons in brain slices, we used voltage ramps in whole-cell recordings of nRt and hippocampal GABAergic neurons. However, we were not able to identify significant differences in persistent currents among the three genotypes in hippocampal (Fig. 3A,B) and thalamic nRt neurons (Fig. 3B, right). The peak amplitudes as well as the voltage dependence of the persistent sodium currents were similar in WT and mutant animals (Fig. 3B; hippocampus: WT mice, $V_{1/2} = -39.3 \pm 2.7$ mV, $n = 11$; *Scn1a*^{RH/+} mice, $V_{1/2} = -38.7 \pm 1.6$ mV, $n = 9$; *Scn1a*^{RH/RH} mice, $V_{1/2} = -38.9 \pm 2.9$ mV, $n = 12$; $p = NS$; nRt: WT mice, $V_{1/2} = 41.6 \pm 6.3$ mV, $n = 15$; *Scn1a*^{RH/+} mice, $V_{1/2} = -40.6 \pm 2.8$ mV, $n = 24$; *Scn1a*^{RH/RH} mice, $V_{1/2} = -43.8 \pm 3.1$ mV, $n = 11$; one-way ANOVA).

Analysis of spike initiation

The results so far clearly demonstrate a deficit in interneuron firing, but did not reveal any detectable changes in fast or persistent Na^+ currents. Nucleated patch recordings report on the properties of somatic Na^+ channels, but much higher densities of Na^+ channels are observed at the AIS, the place of spike initiation (Palmer and Stuart, 2006; Meeks and Mennerick, 2007). Changes at the AIS can clearly change spike initiation and input–output properties of excitatory neurons (Royeck et al., 2008; Wimmer et al., 2010). We hypothesized that spike initiation is altered in interneurons, due to changes in AIS Na^+ channels. During AP trains, we calculated the second derivation of the voltage trace (d^2V/dt^2 ; Fig. 4A, first and last APs in a train during 200 pA current injections for all three genotypes). In these traces, two components could be identified, representing a first phase for the axonal spike component, and a second phase for the somatic spike, with a delay indicating the time from the initiation at the AIS and the arrival at the soma (Royeck et al., 2008; Wimmer et al., 2010).

These two phases were also identified in phase plots in which the first derivation, dV/dt , is plotted versus voltage (Fig. 4B, asterisks). Phase plots of the last APs showed a strong alteration in the portion of the phase plot with a less abrupt initiation phase (green asterisk) in heterozygous and homozygous mice compared with phase plots of the first spike (Fig. 4B). This initiation phase in the AIS can also be quantified as a maximum of the d^2V/dt^2 . Indeed, when the magnitude of the first peak in the d^2V/dt^2 was measured for the first and last AP in a train of APs, there was a significant decrease in membrane potential acceleration for both heterozygous and homozygous mice (WT mice: first, 1203 ± 201 ; last, 1136 ± 299 ; $n = 15$; *Scn1a*^{RH/+} mice: first, 1058 ± 215 ; last, 487 ± 80 ; $n = 14$; *Scn1a*^{RH/RH} mice: first, 628 ± 63 ; last, 375 ± 82 ; $n = 8$). One-way ANOVA with multiple comparisons with the WT group serving as a control (Dunnett's method and *t* test for analysis within the same genotype; Fig. 4C, left axis). Also, the second peak was smaller in mutant animals, but there was no significant change from the first to the last AP in a train (Fig. 4C, right axis). Additionally, the latency was prolonged between the first spike (AIS initiation) and the second peak (somatic invasion) for both heterozygous and homozygous animals, which could be due to both a slower propagation or a

shift in the spike initiation site (WT mice: first, 0.10 ± 0.02 ms; last, 0.09 ± 0.01 ms; $n = 15$; $Scn1a^{RH/+}$ mice: first, 0.14 ± 0.04 ms; last, 0.26 ± 0.07 ms; $n = 14$; $Scn1a^{RH/RH}$ mice: first, 0.18 ± 0.03 ms; last, 0.26 ± 0.04 ms; $n = 8$). *WT versus $Scn1a^{RH/+}/Scn1a^{RH/RH}$ mice, $p < 0.05$; one-way ANOVA with multiple comparisons with the WT group serving as control (Dunnett's method and t test for analysis within the same genotype; Fig. 4D). None of these changes were observed between genotypes when hippocampal pyramidal neurons were studied with identical techniques (data not shown; for similar analysis of hippocampal pyramidal neurons, see also Royeck et al., 2008). In GABAergic nRt neurons, we discovered a similar effect: the latency between AIS and somatic AP peaks was prolonged in heterozygous mice (WT mice: first, 0.17 ± 0.02 ms; last, 0.20 ± 0.02 ms; $n = 23$; $Scn1a^{RH/+}$ mice: first, 0.21 ± 0.03 ms; last, 0.3 ± 0.03 ms; $n = 37$; $p < 0.05$). Together with the lack of significant changes in somatic fast Na^+ currents, these data suggest that the R1648H mutation specifically causes a dysfunction of the AIS and spike initiation in GABAergic interneurons.

Recordings of spontaneous synaptic activity in thalamic and cortical neurons

We next examined the postsynaptic effects of the reduced activity of inhibitory neurons. We recorded spontaneous IPSCs (sIPSCs) in different neurons of the thalamocortical circuit receiving inhibitory input, namely, in cortical LV pyramidal cells, in GABAergic nRt neurons inhibiting themselves reciprocally, and in excitatory thalamocortical relay neurons (Fig. 1A). For all three subtypes, we found significantly reduced frequencies of sIPSCs in heterozygous compared with WT animals (cortical pyramidal neurons: WT mice, 9.7 ± 0.3 Hz, $n = 5$; $Scn1a^{RH/+}$ mice, 6.7 ± 0.5 Hz, $n = 10$; $p < 0.05$; nRt neurons: WT mice, 2.7 ± 0.5 Hz, $n = 10$; $Scn1a^{RH/+}$ mice, 1.6 ± 0.3 Hz, $n = 10$; $p < 0.05$; relay neurons: WT mice, 10.5 ± 2.3 Hz, $n = 12$; $Scn1a^{RH/+}$ mice, 5.1 ± 1.1 Hz, $n = 12$; $p < 0.05$, Mann–Whitney test; Fig. 5A–F), whereas the amplitudes were similar (cortical pyramidal neurons: WT mice, -64.7 ± 7.5 pA, $n = 5$; $Scn1a^{RH/+}$ mice, -58.5 ± 2.0 pA, $n = 10$; nRt neurons: WT mice, -56.9 ± 3.6 pA, $n = 10$; $Scn1a^{RH/+}$ mice, -53.0 ± 3.6 pA, $n = 10$; relay neurons: WT mice, 38.8 ± 5.6 pA, $n = 12$; $Scn1a^{RH/+}$ mice, 32.6 ± 3.6 pA, $n = 12$; Mann–Whitney test). When APs were blocked by $1 \mu M$ tetrodotoxin (TTX) application to record miniature IPSCs (mIPSCs), there was no longer a difference between nRt neurons of WT and $Scn1a^{RH/+}$ mice (nRt neurons: WT mice: frequency, 2.5 ± 0.4 Hz; amplitude, -42.8 ± 5.2 pA, $n = 8$; $Scn1a^{RH/+}$ mice: frequency, 2.6 ± 0.5 Hz; amplitude, -47.7 ± 2.2 pA, $n = 9$; VB neurons: WT mice: frequency, 3.44 ± 0.67 Hz; amplitude, -24.7 ± 4.1 pA, $n = 10$; $Scn1a^{RH/+}$ mice: frequency, 2.7 ± 0.5 Hz; amplitude, -17.4 ± 0.9 pA, $n = 9$; Mann–Whitney rank-sum test). This clearly

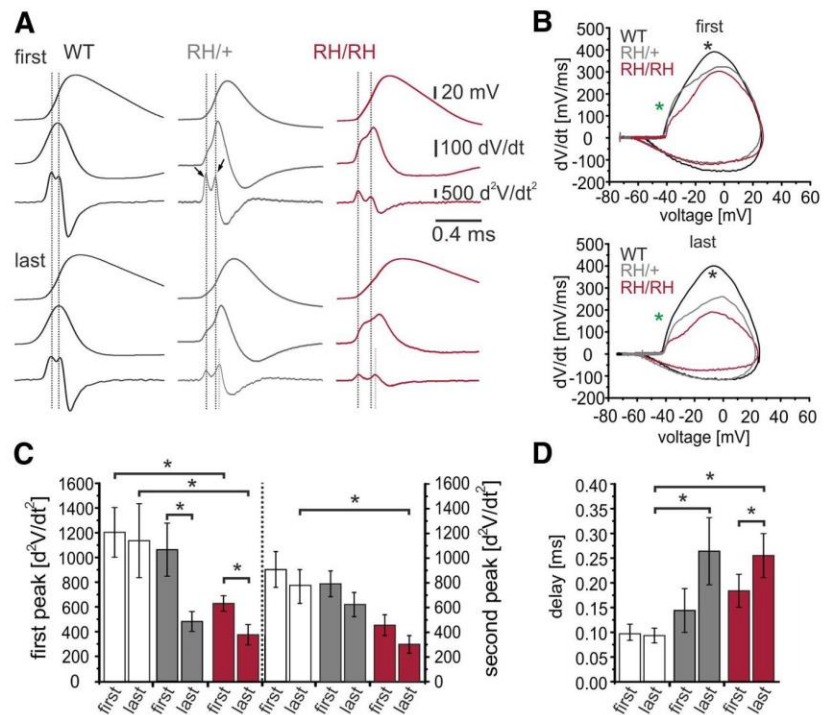


Figure 4. Analysis of AP initiation. **A**, Representative traces of first (top block) and last (bottom block) spikes (top traces) and their corresponding first (middle trace) and second (bottom trace) derivations of hippocampal FS inhibitory neurons of WT, $Scn1a^{RH/+}$, and $Scn1a^{RH/RH}$ mice (CA1 stratum oriens). Black dotted lines illustrate the delay between the first (axonal) and the second (somatic) peaks; gray dotted lines illustrate the increased delay between the two peaks for the last spike recorded from mutated animals. **B**, Representative phase plots of dV/dt vs V for first (top) and last (bottom) spikes generated from recordings, as in **A**. Asterisks mark the beginning of the two phases of action potential initiation in the axon initial segment (green asterisk) and in the soma (black asterisk). **C**, Left, Amplitudes of the first axonal peaks in the second derivation of the first and last occurring spikes within AP trains, $*p < 0.05$. Right, Amplitudes of the second somatic peaks in the second derivation of the first and last occurring spikes within AP trains, $*p < 0.05$. **D**, Delay between the first (axonal) and second (somatic) peaks of the first and last APs. One-way ANOVA with multiple comparisons, with the WT group serving as control (Dunnett's method) and t test for analysis within the same genotype. WT mice, white, $n = 15$; $Scn1a^{RH/+}$ mice, gray, $n = 14$; $Scn1a^{RH/RH}$ mice, red, $n = 8$.

indicates a normal number of functional GABAergic synapses and an intact release machinery, and points toward a firing deficit of inhibitory neurons with a failure of orthodromic action potential propagation along the axons as the major source of reduced GABAergic activity.

Synaptic GABA release activates synaptic as well as extrasynaptic GABA receptors, which gives rise to a tonic GABA-mediated current. This current is prominent in thalamocortical VB neurons (Jia et al., 2005) and is enhanced in several animal models of absence epilepsy (Cope et al., 2009). Both WT and heterozygous mice showed typical tonic inhibitory currents, which could be blocked by picrotoxin (Fig. 5G), but the magnitude of the tonic GABA current was significantly reduced in heterozygous mice compared with control mice (WT mice: 0.51 ± 0.11 pA/pF, $n = 9$ neurons in 9 slices; $Scn1a^{RH/+}$ mice: 0.18 ± 0.03 pA/pF, $n = 7$ neurons in 7 slices, $p < 0.01$; Fig. 5H).

Assessment of spontaneous network activity

To determine how mutant $Na_v1.1$ channels affect neuronal network activity, we applied three different techniques. As a first screening experiment, we used primary hippocampal cultures from WT and heterozygous animals, and plated them on 60-channel MEAs. Neuronal activities were illustrated using spike raster plots, in which spikes recorded on each electrode are plotted over time (Fig. 6A). In contrast to cultures derived from WT

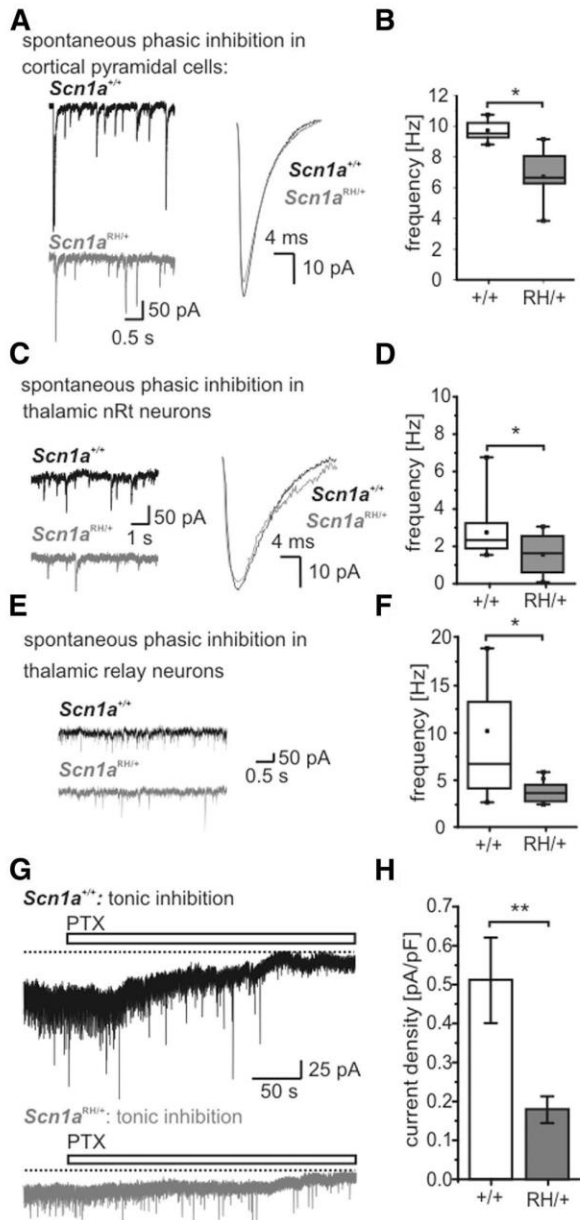


Figure 5. Phasic and tonic inhibition. **A, C, E**, Left, Representative whole-cell current traces recorded from cortical pyramidal neurons (layer V; **A**), nRt neurons (**C**), and thalamic relay neurons (**E**) in thalamocortical slices from WT (top traces) and *Scn1a*^{RH/+} (bottom traces) animals. Membrane voltage clamped to -70 mV. Right, Superimposed average sIPSCs from WT (cortex, $n = 821$ sIPSCs; nRt, $n = 219$ sIPSCs) and *Scn1a*^{RH/+} animals (cortex, $n = 519$ sIPSCs; nRt, $n = 173$ sIPSCs). **B, D, F**, The sIPSC frequency as recorded in **A, C**, and **E** was reduced for *Scn1a*^{RH/+} animals in all three neuronal subtypes. Cortical pyramidal neurons (**B**): WT mice, $n = 5$; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 10$; nRt neurons (**D**): WT mice, $n = 10$; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 10$; relay neurons (**F**): WT mice, $n = 12$; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 12$; * $p < 0.05$; Mann–Whitney test. **G**, Whole-cell patch-clamp recordings of tonic GABA-sensitive current in thalamic relay neurons from a WT (top) and a heterozygous animal (bottom). Tonic inhibition could be blocked by application of the GABA receptor blocker picrotoxin (PTX). **H**, Current density (pA/pF) was significantly decreased in neurons of *Scn1a*^{RH/+} animals: WT mice, $n = 9$; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 7$, ** $p < 0.01$, Student's *t* test.

mice, cultures from heterozygous animals showed intermittent periods of low activity, interspersed with long periods of highly synchronous activity (Fig. 6A, blue boxes indicating population bursts). This could be quantified as an increased intraburst spike

frequency (Fig. 6B, PFR of population bursts), a reduced number of bursts (Fig. 6C) with a longer duration (Fig. 6D), and longer interburst intervals (Fig. 6E). However, the relative number of spikes occurring within or outside a population burst was similar between cultures from WT and heterozygous animals (WT mice: $96.3 \pm 0.8\%$; $n = 12$; *Scn1a*^{RH/+} mice: $97.2 \pm 1.3\%$; $n = 9$; $p = \text{NS}$), due to the many short population bursts in cultures from WT animals. These results thus show an altered organization of discharges in neurons from mutant animals, with increased occurrence of high-frequency, long-lasting synchronized activity.

If these differences between WT and heterozygous animals are due to a deficit in GABAergic synaptic transmission in the latter group, then pharmacological inhibition of GABA receptors should exert larger effects in cultures from WT animals. We therefore applied the GABA_A receptor antagonist bicuculline on MEAs plated with neurons from WT and heterozygous animals. Bicuculline application on cultures from WT mice led to significant changes in bursting behavior, causing a reorganization of discharge behavior in the form of higher frequency, fewer burst periods with increased interburst intervals, but not significantly longer bursts (Fig. 6A–E). In addition, the percentage of spikes occurring within population bursts increased significantly with bicuculline in cultures from WT animals (from $96.3 \pm 0.8\%$ before to $99.7 \pm 0.1\%$ after bicuculline application; $n = 12$; $p < 0.001$). In stark contrast, changes in population bursts from cultures of *Scn1a*^{RH/+} animals were much smaller, and not statistically significant in any of these parameters (Fig. 6B–E; $97.2 \pm 1.3\%$ of spikes within bursts before bicuculline application; $99.5 \pm 0.5\%$ spikes within bursts after bicuculline application; $n = 9$).

To quantify the firing synchrony of the plated neuronal networks, we evaluated Cohen's κ statistic across all pairs of active electrodes. The network activity recorded from cultures of WT animals showed a 1.8-fold increase of κ values upon application of bicuculline, indicating a higher synchrony (from 0.38 ± 0.05 at baseline to 0.56 ± 0.03 in bicuculline; $p < 0.01$; $n = 12$). In cultures of *Scn1a*^{RH/+} animals, the κ statistic was already 0.51 ± 0.04 at baseline without a significant increase in bicuculline (0.53 ± 0.04 ; $n = 9$). Using the ratio of κ values after and before bicuculline application, we found that the increase in synchrony was significantly larger in cultures from WT animals compared with ones from heterozygous animals (Fig. 6F). Altogether, our findings indicate that cultures from heterozygous animals show hyperexcitable networks with increased synchrony compared with the WT. Since blocking GABA_A receptors has significant effects only in neurons from WT mice, but not in those from heterozygous mice, these results are consistent with the idea that increased synchrony in *Scn1a*^{RH/+} networks is due to a deficit in GABAergic synaptic transmission.

Second, we tested the impact of the R1648H mutation on network activity in acute thalamocortical slices. We recorded extracellular field potentials in LIV and LV of the neocortical S1 region, in the thalamic VB and nRt. The presence of functional thalamocortical connections was tested by stimulating the VB and recording the monosynaptic response in LIV (Agmon and Connors, 1991), showing no significant differences between heterozygous and WT mice (Fig. 7A). Paired-pulse stimulations did not disclose statistically significant differences either (Fig. 7A). However, we found spontaneous discharges in 16 of 17 slices obtained from heterozygous mice (Fig. 7B), which were observed in only 5 of 12 slices from WT littermates (Fig. 7C; $p = 0.003$, Fisher's exact test). Multielectrode recordings in cortex and thalamus showed simultaneous spontaneous activity spreading in

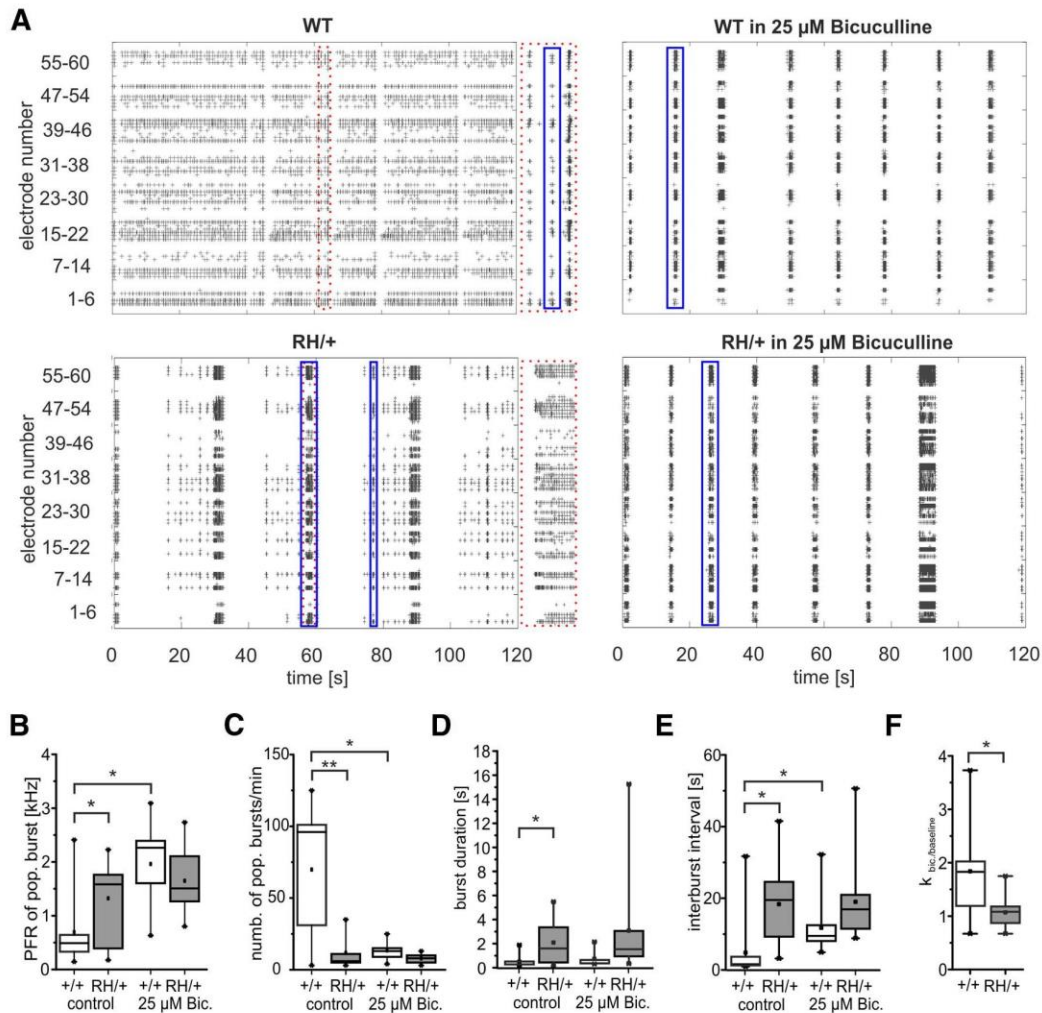


Figure 6. Network activities of primary neuronal cultures recorded on multielectrode arrays. **A**, Spike raster plots of all 60 recorded electrodes with spikes represented as “+” over time of primary cultures of WT (top) and heterozygous animals (bottom), each shown without (left) and after application of bicuculline (Bic.; 25 μ M, right). The y-axis represents the electrode number within an MEA configuration of 8 \times 8 electrodes. Area within red dashed box in spike raster plot of primary culture of a WT animal (top left) and a heterozygous animal (bottom left) is shown enlarged to the right. Blue boxes highlight examples of population bursts within the different spike raster plots. Note that the spike raster plot of the culture from a heterozygous animal shows a high variability in the duration of the population bursts. **B**, Box plots of PFR of population bursts before and after Bic. application for WT (white) and heterozygous animals (gray). WT mice, $n = 12$; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 9$; * $p < 0.05$, ANOVA on ranks. **C**, Box plots of number of population bursts for cultures from heterozygous (gray) and WT (white) animals. WT mice, $n = 12$; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 9$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA on ranks. **D**, Box plots of burst duration for cultures from heterozygous (gray) and WT (white) animals. WT mice, $n = 12$; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 9$; * $p < 0.05$, Mann-Whitney test. **E**, Box plots of interburst interval for cultures from heterozygous (gray) and WT (white) animals. WT mice, $n = 12$; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 9$; * $p < 0.05$, ANOVA on ranks. **F**, Box plots of κ ratio 25 μ M Bic./baseline for recordings from cultures of heterozygous (gray) and WT (white) animals. WT mice, $n = 12$; *Scn1a*^{RH/+} mice, $n = 9$; * $p < 0.05$, Mann-Whitney test.

different areas of the thalamocortical loop only in slices from heterozygous mice (9 of the 16 slices showed spontaneous activity at all four electrodes; Fig. 7*B,E*; Table 3). Furthermore, spontaneous activities were more frequent in slices from heterozygous mice compared with WT mice (Fig. 7; Table 3). The area in which discharges were first generated during simultaneous activity was variable (Fig. 7*B,E*; Table 3). In slices from heterozygous mice, simultaneous activities were larger than nonsimultaneous ones, with the latter having amplitudes similar to those observed in slices from WT mice. Few activities in slices from WT mice had amplitudes comparable to those of simultaneous heterozygous ones, but they did not spread to other areas (Fig. 7*C*; Table 3). Analysis of spontaneous cortical sharp waves showed HFOs in slices of *Scn1a*^{RH/+} mice in both the physiological (40–200 Hz) and the pathological (200–600 Hz) range (Fig. 7*B,D*; Table 3). In

contrast, HFOs were hardly seen in slices from WT mice, including activities with amplitudes comparable to those seen in slices of mutant mice (Fig. 7*C,D*; Table 3).

Third, we studied the network activity of neuronal populations in the hippocampal CA1 region using multineuron Ca^{2+} imaging in hippocampal slices of WT, heterozygous, and homozygous animals. Following a bulk-loading technique with the Ca^{2+} indicator OGB-1AM (Fig. 8*A*), we captured spontaneous network activity in simultaneous recordings of hundreds of neurons (159 ± 94 cells per slice; Fig. 8*A,B*, examples). Ca^{2+} traces were converted to raster plots to determine the dynamics of neuronal spiking activity. Figure 8, *C* and *D*, shows that the average spontaneous discharge rate of neurons in the population was increased in heterozygous and homozygous animals compared with WT animals (WT mice: 0.0020 ± 0.0002 Hz; $n = 294$ cells;

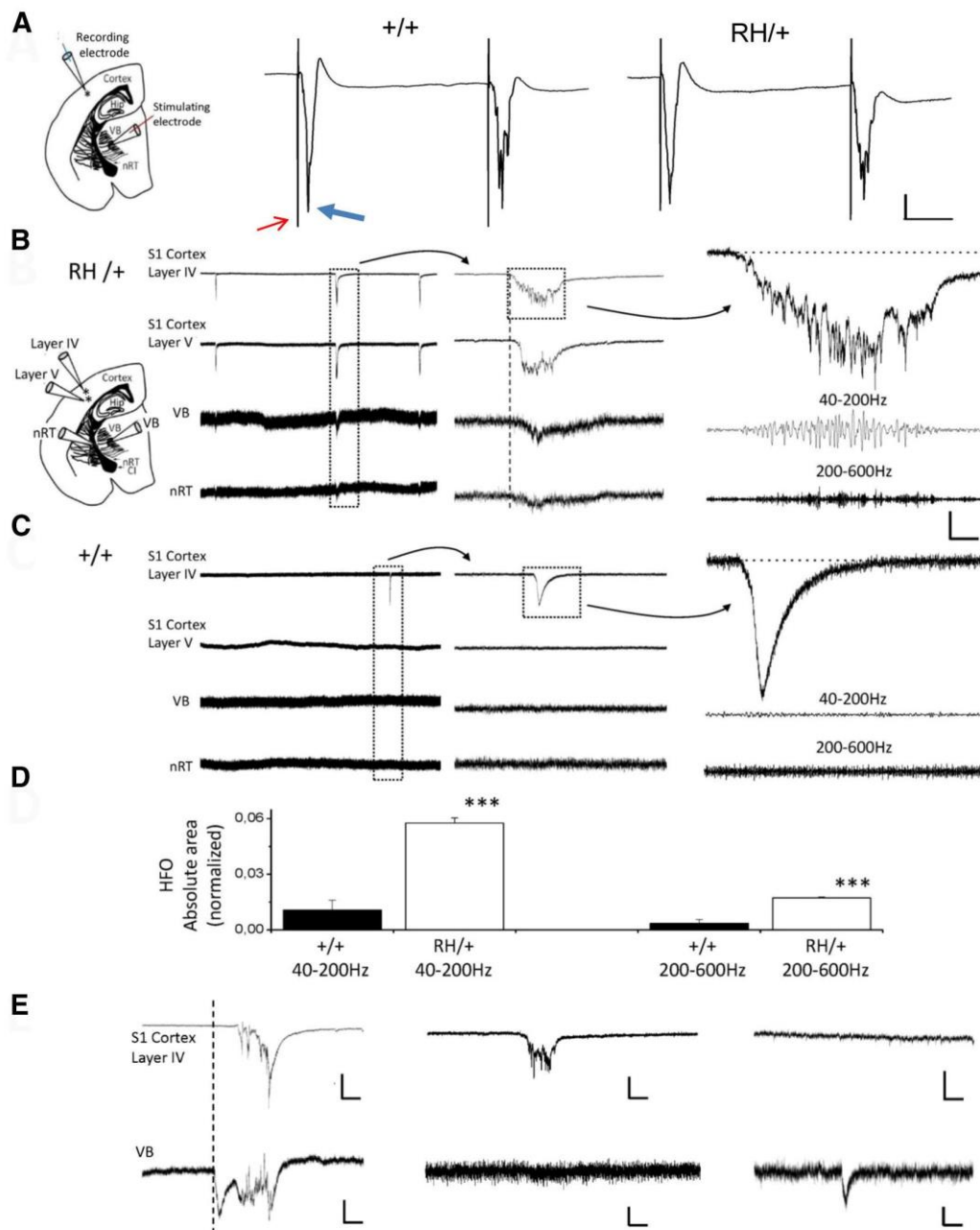


Figure 7. Field potential recordings of network activity in thalamocortical slices. **A**, Representative voltage traces of cortical layer IV responses to paired-pulse stimulations of thalamus (VB) with IPI of 100 ms in slices of $Scn1a^{+/+}$ (left) and $Scn1a^{RH/+}$ (right) animals; schematic shows electrode position. The thin red arrow highlights the stimulus artifact; the thick blue arrow highlights the monosynaptic response. Maximum amplitude: 2.7 ± 0.6 mV ($n = 12$) for $Scn1a^{+/+}$ mice; 3.4 ± 0.7 mV ($n = 17$) for $Scn1a^{RH/+}$ mice. Half-width: 3.1 ± 0.5 ms ($n = 12$) for WT mice; 3.8 ± 0.7 ms ($n = 17$) for $Scn1a^{RH/+}$ mice. Coastline index: 13.68 ± 0.52 ($n = 12$) for $Scn1a^{+/+}$ mice; 14.55 ± 0.94 ($n = 17$) for $Scn1a^{RH/+}$ mice. Paired-pulse ratio computed using maximum amplitudes: 50 ms IPI: 0.80 ± 0.12 ($n = 5$) for $Scn1a^{+/+}$ mice; 0.91 ± 0.09 ($n = 5$) for $Scn1a^{RH/+}$ mice; 100 ms IPI: 0.85 ± 0.19 ($n = 5$) for $Scn1a^{+/+}$ mice; 0.91 ± 0.09 ($n = 5$) for $Scn1a^{RH/+}$ mice; 150 ms IPI: 0.74 ± 0.03 ($n = 5$) for $Scn1a^{+/+}$ mice; 0.77 ± 0.16 ($n = 5$) for $Scn1a^{RH/+}$ mice; 200 ms IPI: 0.71 ± 0.05 ($n = 5$) for $Scn1a^{+/+}$ mice; 0.78 ± 0.15 ($n = 5$) for $Scn1a^{RH/+}$ mice. Paired-pulse ratio computed using coastline index: 50 ms IPI: 1.18 ± 0.07 ($n = 5$) for $Scn1a^{+/+}$ mice; 1.05 ± 0.14 ($n = 5$) for $Scn1a^{RH/+}$ mice; 100 ms IPI: 1.48 ± 0.13 ($n = 5$) for $Scn1a^{+/+}$ mice; 1.49 ± 0.18 ($n = 5$) for $Scn1a^{RH/+}$ mice; 150 ms IPI: 1.19 ± 0.12 ($n = 5$) for $Scn1a^{+/+}$ mice; 1.16 ± 0.20 ($n = 5$) for $Scn1a^{RH/+}$ mice; 200 ms IPI: 1.62 ± 0.18 ($n = 5$) for $Scn1a^{+/+}$ mice; 1.41 ± 0.31 ($n = 5$) for $Scn1a^{RH/+}$ mice. Calibration: 1 mV, 25 ms. **B**, **C**, Representative voltage traces of spontaneous extracellular activity in slices of $Scn1a^{RH/+}$ (**B**) and $Scn1a^{+/+}$ (**C**) animals recorded in cortical layers IV and V, thalamic VB, and nRT. Placement of the recording electrodes is shown in the schematic on the left (Cl, capsula interna). Middle traces, Time expansions of the trace segments outlined by the dotted box in the left traces, showing that in this slice (**B**, $Scn1a^{RH/+}$) simultaneous activities began in cortical layers (vertical dashed line; see **E** for activities of thalamic origin). Right traces, Cortical sharp waves outlined by the dotted box in the middle traces and the corresponding 40–200 and 200–600 Hz HFOs, which were hardly observed in WT mice. Calibration: left traces, 900 μ V, 1.1 s; middle traces, 900 μ V, 500 ms; right traces, 200 μ V, 100 ms. **D**, Absolute areas of HFOs in the 40–200 and 200–600 Hz ranges. HFOs were noise subtracted and normalized to the area of the corresponding sharp wave (see Materials and Methods). **E**, Simultaneous recordings in the cortical layer IV (top) and the VB (bottom) of slices from $Scn1a^{RH/+}$ animals displaying spontaneous activities with thalamic origin; left traces, activity generated in cortex without spread to thalamus; right traces, activity generated in thalamus without spread to cortex. Calibration: top left and middle traces, 500 μ V, 250 ms; top right trace, 100 μ V, 250 ms; bottom left trace, 150 μ V, 250 ms; bottom middle and right traces, 50 μ V, 250 ms.

Table 3. Properties of spontaneous extracellular field potential activities in thalamocortical slices

	WT mice	<i>n</i>	<i>Scn1a</i> ^{RH/+} mice	<i>n</i>
Spontaneous total activity	12 slices		17 slices	
Frequency, cortex LIV	0.16 ± 0.08 min ⁻¹	21	0.52 ± 0.08 min ⁻¹ *	139
Frequency, thalamus VB	0.14 ± 0.11 min ⁻¹	11	0.65 ± 0.13 min ⁻¹ *	137
Nonsimultaneous activities (mV)				
Amplitude, cortex LIV	0.26 ± 0.03		0.28 ± 0.04	
Amplitude, thalamus VB	0.11 ± 0.01		0.09 ± 0.01	
Simultaneous corticothalamic activities				86
Cortical generation (%)			29.1%	
Thalamic generation (%)			32.6%	
Unclear (%)			39.5%	
Amplitude, cortex LIV (mV)			1.24 ± 0.06** <i>a</i>	
Amplitude, thalamus VB (mV)			0.21 ± 0.05** <i>b</i>	
Cortical HFOs 40–200 Hz		21		100
Absolute area (mV/ms) ^c	1.2 ± 0.4		30.6 ± 1.8**	
Normalized absolute area ^d	0.011 ± 0.005		0.058 ± 0.003**	
Cortical HFOs 200–600 Hz		21		100
Absolute area (mV/ms) ^c	0.51 ± 0.17		7.25 ± 0.47**	
Normalized absolute area ^d	0.003 ± 0.002		0.017 ± 0.001**	

Data are presented as means ± SEM. *n*, Number of analyzed activities.

^aIn comparison to layer IV non-simultaneous activities (Wilcoxon signed rank test).

^bIn comparison to thalamic VB non-simultaneous activities (Wilcoxon signed rank test).

^cNoise in absolute area subtracted from HFOs absolute area (see Materials and Methods).

^dHFO absolute area noise subtracted normalized to the absolute area of the spontaneous activity (0.1 Hz–1 kHz filtered; see Materials and Methods).

p* < 0.05 and *p* < 0.001, Mann–Whitney rank-sum test or, when noted, Wilcoxon signed rank test.

Scn1a^{RH/+} mice: 0.0117 ± 0.0007 Hz; *n* = 1502 cells; *Scn1a*^{RH/RH} mice: 0.0139 ± 0.0008 Hz; *n* = 640 cells; *p* < 0.05, one-way ANOVA with multiple comparisons, with the WT group serving as the control (Dunnett's method; Fig. 8D). Evaluation of firing frequencies summarized from all recorded cells and plotted in a double logarithmic histogram revealed frequencies >0.01 Hz in heterozygous and homozygous mice (Fig. 8C, gray and red lines), which was not observed in WT mice (Fig. 8C, black line). Altogether, these findings demonstrate that neuronal networks in different brain areas are spontaneously more active in mutant mice compared with WT mice.

Discussion

We here performed a comprehensive neurophysiological analysis of an epilepsy-causing Na_v1.1 mutation in different brain regions of a gene-targeted mouse model. This model recapitulates the human GEFS+ phenotype, showing spontaneous generalized seizures and a reduced threshold to thermally induced seizures (Martin et al., 2010). Recordings from mutant mice compared with WT mice at P14–P20 revealed that the mutation reduces firing in all studied inhibitory interneurons, but did not affect the examined excitatory neurons. These results show that at this age Na_v1.1 is a major Na⁺ channel of interneurons but does not contribute to AP firing in excitatory neurons. This corresponds to previous immunohistochemical studies (Ogiwara et al., 2007), recordings from dissociated neurons (Yu et al., 2006; Mistry et al., 2014), and preferential inactivation of Na_v1.1 in hippocampal and cortical parvalbumin-positive interneurons causing spontaneous seizures, in contrast to Na_v1.1 knockout in pyramidal cells (Dutton et al., 2012). Even though recent studies suggest a modifying protective role of Na_v1.1 in glutamatergic neurons (Ogiwara et al., 2013) and increased Na⁺ current density in

dissociated pyramidal neurons at older ages (Mistry et al., 2014), our data suggest that interneurons in this model play a crucial role for epileptogenesis, even though there might be additional factors sustaining the epileptic state.

Relevant biophysical defect and involved neuronal compartments

Studies in heterologous expression systems have revealed both loss-of-function and gain-of-function mechanisms for this mutation (Alekov et al., 2000; Spampanato et al., 2001; Lossin et al., 2002). Our analysis of the human Na_v1.1 mutation in tsA201 cells reveals the following three loss-of-function defects, which could explain the observed reduced firing: (1) a small but significant change in the slope of the fast steady-state inactivation curve; (2) probably most importantly, an enhanced slow inactivation; and (3) a reduced current density.

However, we did not find significant differences between WT and mutant animals in channel gating and in the persistent Na⁺ current in interneurons, in contrast with the differences observed in tsA201 cells. Although the biophysical properties of Na⁺ channels in neurons may differ from those in tsA201 cells and between species (mouse vs human), the observed changes in neuronal firing are difficult to explain on the basis of our neuronal Na⁺ channel recordings. Rather, they suggest that the somatic channel population in nucleated patches does not fully represent mutated loss-of-function channels and that other Na⁺ channels might carry a major part of the current. For example, Na_v1.6 is expressed in hippocampal interneurons (Van Wart et al., 2007; Lorincz and Nusser, 2008; Mistry et al., 2014), and Na_v1.3 may be compensatorily upregulated (Yu et al., 2006). Most of the functionally relevant Na_v1.1 channels may in fact reside in the AIS and along whole axons where Na⁺ channels are concentrated (Rasband, 2010; Hu and Jonas, 2014). Accordingly, our data indicated a mainly axonal dysfunction increasing with prolonged AP series in GABAergic neurons. This could be explained by enhanced slow inactivation of mutated Na⁺ channels (as recorded in tsA201 cells), reducing the number of available channels with prolonged firing. The longer latencies between spike initiation and somatic invasion could be due to impaired propagation or a shift of the spike initiation site. Our results thus suggest that the inhibitory AIS (or whole axon according to Hu and Jonas, 2014) is the major site of Na_v1.1 channel dysfunction in our model, and that enhanced slow inactivation represents the most important gating defect of R1648H mutant channels.

R1648H causes a reduction of inhibitory inputs

GABAergic inhibition controls neuronal excitability and a reduction in inhibition plays an important pathophysiological role in genetic and acquired epilepsies (Redecker et al., 2000; Reid et al., 2009; Ben-Ari and Dudek, 2010). Assessing the impact of reduced firing of inhibitory neurons on postsynaptic neurons and network dysfunction, our recordings of sIPSCs demonstrate that reduced AP firing of interneurons indeed translates into reduced GABAergic synaptic activity by failure of AP propagation from the AIS to the synaptic terminals in mutant animals compared with WT animals. The synaptic release machinery, however, was unaffected, as revealed by normal mIPSCs in the presence of TTX. Additionally, we found a decreased tonic inhibition mediated by activation of GABA_A receptors located outside the synaptic cleft, which can be explained by a reduced spontaneous GABA spillover from presynaptic terminals. Interestingly, tonic inhibition is increased in several rodent models of absence epilepsy (Cope et al., 2009), which is consistent with a different mecha-

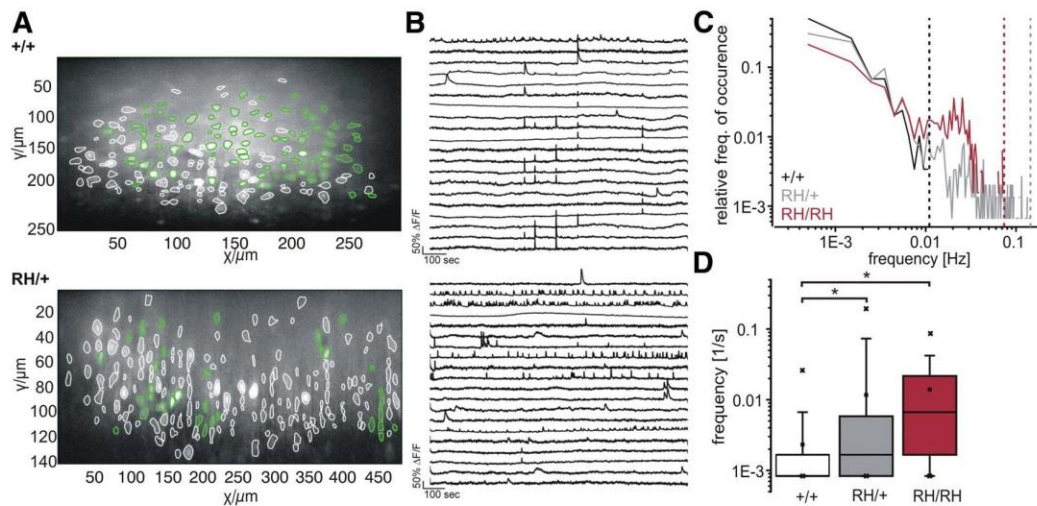


Figure 8. Multineuron Ca^{2+} imaging in the hippocampal CA1 region. **A**, Samples of slices loaded with the Ca^{2+} dye OGB-1-AM of WT (top) and $\text{Scn1a}^{\text{RH}/+}$ (bottom) animals. Active cells filled with OGB-1-AM are marked in green, inactive cells filled with the dye are marked in white. **B**, Ca^{2+} transients of 20 representative spontaneously active cells recorded in the slices shown in **A**. **C**, Double logarithmic histogram showing the binned frequency of Ca^{2+} spikes normalized to the overall number of active cells (bin width at 0.001 Hz). Note that for slices from WT animals (black), spike frequencies of >0.01 Hz were absent, but that higher frequencies were frequently seen for mutant animals (gray and red). Dashed lines represent the maximum frequencies observed in slices of WT (black), $\text{Scn1a}^{\text{RH}/+}$ (gray), and $\text{Scn1a}^{\text{RH}/\text{RH}}$ (red) animals. **D**, Logarithmic presentation of Ca^{2+} spike frequency as box plots plotted for all three genotypes (WT mice, 294 cells; $\text{Scn1a}^{\text{RH}/+}$ mice, 1502 cells; $\text{Scn1a}^{\text{RH}/\text{RH}}$ mice, 640 cells). Box-and-whisker plots show medians (lines), means (square), lower and upper quartiles, 5% and 95% percentiles represent the minimum and maximum. $p < 0.05$, ANOVA on ranks.

nism of thalamocortical hyperexcitability in $\text{Scn1a}^{\text{RH}/+}$ mice. Although resting membrane potentials in VB neurons were normal, this tonic disinhibition can destabilize the membrane potential, thereby contributing to the shift between different firing modes (tonic vs bursting). Our results thus suggest that a combination of reduced phasic and tonic inhibition contributes to a loss of inhibitory control of neuronal networks, triggering seizures in our mouse model.

Impaired network activity in mutant mice

Our simplified model using cultured neurons on MEAs revealed that the presynaptic *SCN1A* defect affecting fast-spiking interneurons alters the firing behavior of the network. Furthermore, the missing effect of blocking GABA_A receptors in cultures from mutant mice is consistent with the disinhibition caused by the mutation. Other types of interneurons not studied here, like somatostatin-positive neurons regulating the gain of pyramidal cell input–output transformations (Lovett-Barron et al., 2012), could also be involved in causing this firing pattern. Further assessment of neuronal network activity in native brains revealed a widespread spontaneous hyperexcitability. Using multineuron Ca^{2+} imaging, we found an increased frequency of the spontaneous activity of single neurons in the CA1 pyramidal cell layer in mutant compared with WT mice. Multielectrode recordings revealed frequent spontaneous activity that spreads in the entire thalamocortical loop and was generated in variable areas, consistent with a generalized hyperexcitability within the loop. Moreover, cortical activity in heterozygous animals was characterized by the presence of HFOs in both the physiological (40–200 Hz) and the pathological (200–600 Hz) range not observed in WT mice. Human and rodent epileptic tissues exhibit pathological HFOs not found in nonepileptic controls, and HFOs have been proposed to be a biomarker of epileptic foci (Jefferys et al., 2012). Hence, the R1648H-induced disinhibition not only generates hyperexcitability, but also specific epileptic activity. Notably, partial block of GABA_A receptors can also enhance neocortical and hip-

pocampal pathological HFOs (Jones and Barth, 2002; Behrens et al., 2007) and increase the size of HFO-generating areas (Bragin et al., 2002).

Proper firing of inhibitory neurons is essential for correct network function. Cortical and hippocampal FS basket cells innervate the perisomatic regions of pyramidal cells, and can phase and synchronize the activity of large populations of pyramidal cells. These interneurons thus play an essential role in generating and maintaining theta- and gamma-frequency oscillations, for which a rapid system like phasic GABA_A receptor activation is essential to synchronize at high frequencies (Buzsáki and Chrobak, 1995; Cobb et al., 1995). Basket cell maturation is involved in the development of synchronous oscillations, and an impairment of GABA_A interneurons during development can cause neurological disorders like autism, seizures, or schizophrenia (Le Magueresse and Monyer, 2013). The R1648H mutation may therefore also cause developmental alterations, which could contribute to seizure generation, although this effect should be limited to late developmental phases, since $\text{Na}_v1.1$ expression begins at approximately P10 (Ogiwara et al., 2007). Additionally, it has been proposed that dendritic properties of different interneuron subtypes (low Na^+ channel density in FS basket cells and high Na^+ channel density in somatostatin-positive interneurons) could be involved in setting their differential activity in a neuronal network (Martina et al., 2000; Hu et al., 2010). Alterations in dendritic $\text{Na}_v1.1$ channels in different interneuron types could additionally impact the activity and synchronization of neuronal networks.

In the thalamic nRt, a disturbance of the inhibitory neurons is involved in spike-and-wave discharges during generalized absence seizures (Danober et al., 1998). Likewise, a reduction of GABA_A receptor-mediated inhibition in reticular neurons (by knockout of the GABA_A receptor β_3 -subunit or modification of benzodiazepine binding to the α_3 -subunit) leads to pathological synchronization of thalamocortical oscillations, as seen in absence seizures (Huntsman et al., 1999; Christian et al., 2013). Our

observed disinhibition can thus disturb the synchronization and function of whole networks and can explain the generation of epileptic seizures.

The variability in seizure types occurring with mutations in the same gene is particularly high in GEFS+ including febrile and afebrile generalized tonic–clonic seizures, absences, and even focal seizures originating from the temporal lobe (Scheffer and Berkovic, 1997; Weber and Lerche, 2008; Marini and Mantegazza, 2010). Specifically, individuals carrying the R1648H mutation exhibited febrile, afebrile generalized tonic–clonic and absence seizures (Baulac et al., 1999). Many circumstances may contribute to the phenotypic variability, including genetic modifiers and environmental factors (Glasscock et al., 2007; Martin et al., 2007). The widespread functional alterations we observed here may be a prerequisite for this phenomenon.

References

- Agmon A, Connors BW (1991) Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex *in vitro*. *Neuroscience* 41:365–379. [CrossRef Medline](#)
- Alekov A, Rahman MM, Mitrovic N, Lehmann-Horn F, Lerche H (2000) A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation *in vitro*. *J Physiol* 529:533–539. [CrossRef Medline](#)
- Allène C, Cattani A, Ackman JB, Bonifazi P, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Cossart R (2008) Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J Neurosci* 28:12851–12863. [CrossRef Medline](#)
- Baulac S, Gourfinkel-An I, Picard F, Rosenberg-Bourgin M, Prud'homme J-F, Baulac M, Brice A, LeGuern E (1999) A second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21–q33. *J Hum Genet* 65:1078–1085. [CrossRef](#)
- Beenhakker MP, Huguenard JR (2009) Neurons that fire together also conspire together: is normal sleep circuitry hijacked to generate epilepsy? *Neuron* 62:612–632. [CrossRef Medline](#)
- Behrens CJ, van den Boom LP, Heinemann U (2007) Effects of the GABA_A receptor antagonists bicuculline and gabazine on stimulus-induced sharp wave-ripple complexes in adult rat hippocampus *in vitro*. *Eur J Neurosci* 25:2170–2181. [CrossRef Medline](#)
- Ben-Ari Y, Dudek FE (2010) Primary and secondary mechanisms of epileptogenesis in the temporal lobe: there is a before and an after. *Epilepsy Curr* 10:118–125. [CrossRef Medline](#)
- Bragin A, Mody I, Wilson CL, Engel J Jr (2002) Local generation of fast ripples in epileptic brain. *J Neurosci* 22:2012–2021. [Medline](#)
- Buzsáki G, Chrobak JJ (1995) Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr Opin Neurobiol* 5:504–510. [CrossRef Medline](#)
- Cestèle S, Scalmani P, Rusconi R, Terragni B, Franceschetti S, Mantegazza M (2008) Self-limited hyperexcitability: functional effect of a familial hemiplegic migraine mutation of the Na_v1.1 (SCN1A) Na⁺ channel. *J Neurosci* 28:7273–7283. [CrossRef Medline](#)
- Christian CA, Herbert AG, Holt RL, Peng K, Sherwood KD, Pangratz-Fuehrer S, Rudolph U, Huguenard JR (2013) Endogenous positive allosteric modulation of GABA(A) receptors by diazepam binding inhibitor. *Neuron* 78:1063–1074. [CrossRef Medline](#)
- Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P (2001) De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *J Hum Genet* 68:1327–1332. [CrossRef](#)
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378:75–78. [CrossRef Medline](#)
- Contreras D, Curró Dossi R, Steriade M (1992) Bursting and tonic discharges in two classes of reticular thalamic neurons. *J Neurophysiol* 68:973–977. [Medline](#)
- Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ, Orbán G, Errington AC, Lorincz ML, Gould TM, Carter DA, Crunelli V (2009) Enhanced tonic GABA_A inhibition in typical absence epilepsy. *Nat Med* 15:1392–1398. [CrossRef Medline](#)
- Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C (1998) Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol* 55:27–57. [CrossRef Medline](#)
- Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, Ferrari MD, Herzog J, van den Maagdenberg AM, Pusch M, Strom TM (2005) Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 366:371–377. [CrossRef Medline](#)
- Dutton SB, Makinson CD, Papale LA, Shankar A, Balakrishnan B, Nakazawa K, Escayg A (2012) Preferential inactivation of *Scn1a* in parvalbumin interneurons increases seizure susceptibility. *Neurobiol Dis* 49C:211–220. [CrossRef Medline](#)
- Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, Brice A, LeGuern E, Moulard B, Chaigne D, Buresi C, Malafosse A (2000) Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* 24:343–345. [CrossRef Medline](#)
- Glasscock E, Qian J, Yoo JW, Noebels JL (2007) Masking epilepsy by combining two epilepsy genes. *Nat Neurosci* 10:1554–1558. [CrossRef Medline](#)
- Grewe BF, Langer D, Kasper H, Kampa BM, Helmchen F (2010) High-speed *in vivo* calcium imaging reveals neuronal network activity with near-millisecond precision. *Nat Methods* 7:399–405. [CrossRef Medline](#)
- Henze DA, González-Burgos GR, Urban NN, Lewis DA, Barrionuevo G (2000) Dopamine increases excitability of pyramidal neurons in primate prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 84:2799–2809. [Medline](#)
- Holekamp TF, Turaga D, Holy TE (2008) Fast three-dimensional fluorescence imaging of activity in neural populations by objective-coupled planar illumination microscopy. *Neuron* 57:661–672. [CrossRef Medline](#)
- Hu H, Jonas P (2014) A supercritical density of Na⁺ channels ensures fast signaling in GABAergic interneuron axons. *Nat Neurosci* 17:686–693. [CrossRef Medline](#)
- Hu H, Martina M, Jonas P (2010) Dendritic mechanisms underlying rapid synaptic activation of fast-spiking hippocampal interneurons. *Science* 327:52–58. [CrossRef Medline](#)
- Huntsman MM, Porcello DM, Homanics GE, DeLorey TM, Huguenard JR (1999) Reciprocal inhibitory connections and network synchrony in the mammalian thalamus. *Science* 283:541–543. [CrossRef Medline](#)
- Illes S, Theiss S, Hartung HP, Siebler M, Dihné M (2009) Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations. *BMC Neurosci* 10:93. [CrossRef Medline](#)
- Jefferys JG, Menendez de la Prida L, Wendling F, Bragin A, Avoli M, Timofeev I, Lopes da Silva FH (2012) Mechanisms of physiological and epileptic HFO generation. *Prog Neurobiol* 98:250–264. [CrossRef Medline](#)
- Jia F, Pignataro L, Schofield CM, Yue M, Harrison NL, Goldstein PA (2005) An extrasynaptic GABA_A receptor mediates tonic inhibition in thalamic VB neurons. *J Neurophysiol* 94:4491–4501. [CrossRef Medline](#)
- Jones MS, Barth DS (2002) Effects of bicuculline methiodide on fast (>200 Hz) electrical oscillations in rat somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 88:1016–1025. [Medline](#)
- Korn SJ, Giacchino JL, Chamberlin NL, Dingledine R (1987) Epileptiform burst activity induced by potassium in the hippocampus and its regulation by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol* 57:325–340. [Medline](#)
- Lauxmann S, Boutry-Kryza N, Rivier C, Mueller S, Hedrich UB, Maljevic S, Szepietowski P, Lerche H, Lesca G (2013) An SCN2A mutation in a family with infantile seizures from Madagascar reveals an increased sub-threshold Na current. *Epilepsia* 54:e117–e121. [CrossRef Medline](#)
- Lee SH, Govindaiah G, Cox CL (2007) Heterogeneity of firing properties among rat thalamic reticular nucleus neurons. *J Physiol* 582:195–208. [CrossRef Medline](#)
- Le Magueresse C, Monyer H (2013) GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. *Neuron* 77:388–405. [CrossRef Medline](#)
- Liao Y, Anttonen AK, Liukkonen E, Gaily E, Maljevic S, Schubert S, Bellan-Koch A, Petrou S, Ahonen VE, Lerche H, Lehesjoki AE (2010) SCN2A mutation associated with neonatal epilepsy, late-onset episodic ataxia, myoclonus, and pain. *Neurology* 75:1454–1458. [CrossRef Medline](#)
- Liautard C, Scalmani P, Carrier G, de Curtis M, Franceschetti S, Mantegazza M (2013) Hippocampal hyperexcitability and specific epileptiform activity in a mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia* 54:1251–1261. [CrossRef Medline](#)
- Llinás RR, Steriade M (2006) Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J Neurophysiol* 95:3297–3308. [CrossRef Medline](#)

- Lorincz A, Nusser Z (2008) Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci* 28:14329–14340. CrossRef Medline
- Lossin C, Wang DW, Rhodes TH, Vanoye CG, George AL Jr (2002) Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* 34:877–884. CrossRef Medline
- Lovett-Barron M, Turi GF, Kaifosh P, Lee PH, Bolze F, Sun XH, Nicoud JF, Zemelman BV, Sternson SM, Losonczy A (2012) Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat Neurosci* 15:423–430, S1–S3. CrossRef Medline
- Marini C, Mantegazza M (2010) Na⁺ channelopathies and epilepsy: recent advances and new perspectives. *Expert Rev Clin Pharmacol* 3:371–384. CrossRef Medline
- Martina M, Jonas P (1997) Functional differences in Na⁺ channel gating between fast-spiking interneurons and principal neurons of rat hippocampus. *J Physiol* 505:593–603. CrossRef Medline
- Martina M, Vida I, Jonas P (2000) Distal initiation and active propagation of action potentials in interneuron dendrites. *Science* 287:295–300. CrossRef Medline
- Martin MS, Tang B, Papale LA, Yu FH, Catterall WA, Escayg A (2007) The voltage-gated sodium channel *Scn8a* is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mol Genet* 16:2892–2899. CrossRef Medline
- Martin MS, Dutt K, Papale LA, Dubé CM, Dutton SB, de Haan G, Shankar A, Tufik S, Meisler MH, Baram TZ, Goldin AL, Escayg A (2010) Altered function of the *SCN1A* voltage-gated sodium channel leads to γ -aminobutyric acid-ergic (GABAergic) interneuron abnormalities. *J Biol Chem* 285:9823–9834. CrossRef Medline
- Meeks JP, Mennerick S (2007) Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons. *J Neurophysiol* 97:3460–3472. CrossRef Medline
- Mistry AM, Thompson CH, Miller AR, Vanoye CG, George AL Jr, Kearney JA (2014) Strain- and age-dependent hippocampal neuron sodium currents correlate with epilepsy severity in Dravet syndrome mice. *Neurobiol Dis* 65:1–11. CrossRef Medline
- Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, Takeuchi T, Itohara S, Yanagawa Y, Obata K, Furuichi T, Hensch TK, Yamakawa K (2007) Na_v1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation. *J Neurosci* 27:5903–5914. CrossRef Medline
- Ogiwara I, Iwasato T, Miyamoto H, Iwata R, Yamagata T, Mazaki E, Yanagawa Y, Tamamaki N, Hensch TK, Itohara S, Yamakawa K (2013) Na_v1.1 haploinsufficiency in excitatory neurons ameliorates seizure-associated sudden death in a mouse model of Dravet syndrome. *Hum Mol Genet* 22:4784–4804. CrossRef Medline
- Palmer LM, Stuart GJ (2006) Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci* 26:1854–1863. CrossRef Medline
- Rasband MN (2010) The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* 11:552–562. CrossRef Medline
- Redecker C, Luhmann HJ, Hagemann G, Fritschy JM, Witte OW (2000) Differential downregulation of GABA_A receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J Neurosci* 20:5045–5053. Medline
- Reid CA, Berkovic SF, Petrou S (2009) Mechanisms of human inherited epilepsies. *Prog Neurobiol* 87:41–57. CrossRef Medline
- Royeck M, Horstmann MT, Remy S, Reitze M, Yaari Y, Beck H (2008) Role of axonal Na_v1.6 sodium channels in action potential initiation of CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 100:2361–2380. CrossRef Medline
- Rusconi R, Scalmani P, Cassulini RR, Giunti G, Gambardella A, Franceschetti S, Annesi G, Wanke E, Mantegazza M (2007) Modulatory proteins can rescue a trafficking defective epileptogenic Na_v1.1 Na⁺ channel mutant. *J Neurosci* 27:11037–11046. CrossRef Medline
- Scheffer IE, Berkovic SF (1997) Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain* 120:479–490. CrossRef Medline
- Schock SC, Jolin-Dahel KS, Schock PC, Theiss S, Arbuthnot GW, Garcia-Munoz M, Staines WA (2012) Development of dissociated cryopreserved rat cortical neurons *in vitro*. *J Neurosci Methods* 205:324–333. CrossRef Medline
- Spampanato J, Escayg A, Meisler MH, Goldin AL (2001) Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2. *J Neurosci* 21:7481–7490. Medline
- Steriade M (2005) Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. *Trends Neurosci* 28:317–324. CrossRef Medline
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467:60–79. CrossRef Medline
- Tang B, Dutt K, Papale L, Rusconi R, Shankar A, Hunter J, Tufik S, Yu FH, Catterall WA, Mantegazza M, Goldin AL, Escayg A (2009) A BAC transgenic mouse model reveals neuron subtype-specific effects of a Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus (GEFS+) mutation. *Neurobiol Dis* 35:91–102. CrossRef Medline
- Van Wart A, Trimmer JS, Matthews G (2007) Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol* 500:339–352. CrossRef Medline
- Weber YG, Lerche H (2008) Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. *Dev Med Child Neurol* 50:648–654. CrossRef Medline
- Wimmer VC, Reid CA, Mitchell S, Richards KL, Scaf BB, Leaw BT, Hill EL, Royeck M, Horstmann MT, Cromer BA, Davies PJ, Xu R, Lerche H, Berkovic SF, Beck H, Petrou S (2010) Axon initial segment dysfunction in a mouse model of genetic epilepsy with febrile seizures plus. *J Clin Invest* 120:2661–2671. CrossRef Medline
- Woolson R, Clarke W (2002) Statistical methods for the analysis of biomedical data, Ed 2. New York: Wiley-Interscience.
- Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, Spain WJ, McKnight GS, Scheuer T, Catterall WA (2006) Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci* 9:1142–1149. CrossRef Medline
- Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, Reavey E, Duncan J, Forbes GH (2011) Genotype-phenotype associations in *SCN1A*-related epilepsies. *Neurology* 76:594–600. CrossRef Medline

Synthèse de l'article

Dans cette étude, nous avons réalisé une analyse neurophysiologique d'une épilepsie due à la mutation R1648H affectant le canal $Na_v1.1$ sur un modèle murin reproduisant le phénotype des patients atteints de l'EGCF+. Ces expériences ont été réalisées sur des souris porteuses de la mutation $Na_v1.1^{RH/+}$ et WT entre P14-20, âge auquel le canal $Na_v1.1$ est exprimé mais avant que les souris ne soient épileptiques. Ces travaux ont donc pour but d'étudier les modifications des réseaux neuronaux et les pathomécanismes impliqués dans la génération des crises.

1. Propriétés intrinsèques des neurones du réseau TC et de l'hippocampe:

Différents types de neurones ont été enregistrés au sein de la boucle TC et de l'hippocampe grâce à la technique de patch-clamp en configuration cellule-entière (*whole cell*). Au sein du réseau TC, nos collaborateurs ont analysé les propriétés de décharge des neurones excitateurs et inhibiteurs localisés dans les couches IV et V du cortex somatosensoriel (S1), des neurones inhibiteurs du noyau réticulé (nRT) et des neurones excitateurs du thalamus ventrobasal (VB). Au niveau de l'hippocampe, ils ont aussi enregistré les neurones excitateurs et inhibiteurs localisés dans la région CA1.

Dans le réseau TC, les expériences réalisées ont permis de discerner deux types d'interneurones dans le nRT, possédant des propriétés de décharge différentes en réponse aux mêmes injections de courant : certains présentent une bouffée de PA au début de leur décharge alors que d'autres ont une activité tonique. Ces deux types de neurones montrent une diminution du nombre de PA dans les tranches provenant des souris hétérozygotes $Na_v1.1^{RH/+}$ en réponse aux mêmes quantités de courant injecté que les souris WT. En revanche, l'enregistrement des courants provenant des neurones excitateurs de la boucle TC des souris $Na_v1.1^{RH/+}$ ne présentent aucune différence avec ceux provenant des souris WT.

Pour les enregistrements effectués dans l'hippocampe, seuls les neurones excitateurs et les interneurones présentant des décharges de PA rapides (*fast spiking*) ont été analysés, supposés correspondre aux neurones inhibiteurs en forme de panier (*basket cells*). Comme pour les neurones GABAergiques du réseau TC, les neurones inhibiteurs *fast spiking* de l'hippocampe provenant des souris $Na_v1.1^{RH/+}$ ont une diminution du nombre de PA en réponse au courant injecté comparé aux souris WT, alors que les décharges des neurones excitateurs ne sont pas impactés par la mutation.

Des expériences supplémentaires ont été réalisées afin de comprendre plus en détail les mécanismes responsables de l'altération des neurones inhibiteurs. Ainsi, nos collaborateurs ont mis en évidence que l'impact de la mutation R1648H affectait tout particulièrement la fonction des canaux $Na_v1.1$ localisés au niveau du segment initial (SIA) et tout au long de l'axone. Suite à une intense stimulation provoquant une série de décharges, on observe un phénomène « d'inactivation lente » des canaux sodiques. Ici, la mutation provoque une « inactivation lente » prolongée, qui semble altérer l'initiation des PA au niveau du SIA et leur propagation.

Des enregistrements de l'activité synaptique spontanée ont été obtenus en enregistrant les courants post-synaptiques inhibiteurs (CPSI) de différents neurones de la boucle TC recevant des afférences inhibitrices. Une réduction des CPSI est observée à la fois dans les neurones inhibiteurs et excitateurs de la boucle TC des souris porteuses de la mutation hétérozygote R1648H comparé aux souris sauvages. En revanche, lorsque les PA sont bloqués avec de la tétrodothine (TTX), un bloqueur des canaux sodiques, on observe des CPSI miniatures dus à la libération spontanée de vésicules synaptiques sans différence significative entre les neurones des souris mutées et sauvages.

La mutation R1648H entraîne donc une réduction de décharge de PA par les neurones inhibiteurs, qui se traduit en conséquence par une réduction de l'activité synaptique GABAergique, bien que la machinerie synaptique ne soit pas directement affectée.

Ces résultats suggèrent donc que, dès la période pré-épileptique, la mutation provoque une perte de fonction des canaux $Na_v1.1$ affectant sélectivement l'activité des neurones inhibiteurs, sans altérer celle des neurones excitateurs, conduisant à une réduction du contrôle inhibiteur au sein du réseau neuronal, certainement impliqué dans la génération des crises par la suite.

2. Etude des réseaux neuronaux du modèle murin de l'EGCF+

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de la mutation R1648H sur l'activité du réseau neuronal, en utilisant différentes techniques.

➤ La première approche réalisée par nos collaborateurs, consistait à enregistrer des cultures primaires de neurones hippocampiques provenant des animaux WT et hétérozygotes $Na_v1.1^{RH/+}$, en utilisant un système de multiélectrodes en réseau, ou « *multielectrode array* » (MEA). Ce système muni de 60 électrodes, permet d'enregistrer simultanément l'activité extracellulaire provenant de milliers de cellules interconnectées. Cette expérience a révélé une synchronisation excessive des cellules en culture provenant des animaux $Na_v1.1^{RH/+}$ comparés aux WT, reflétant l'activité d'un réseau hyperexcitable. De plus, l'application d'un antagoniste des récepteurs $GABA_A$ montre un effet significatif uniquement sur les neurones des souris WT, mais pas sur ceux des souris hétérozygotes. Ces résultats sont donc en accord avec l'idée que l'hypersynchronisation du réseau neuronal possédant la mutation R1648H est due à un déficit de la transmission synaptique GABAergique.

➤ La seconde approche, réalisée par moi-même, se focalisait sur l'activité du réseau neuronal dans des tranches Thalamo-Corticales (TC) fraîchement prélevées sur des souris WT et hétérozygotes $Na_v1.1^{RH/+}$ âgées de 16 à 20 jours. J'ai donc effectué des tranches en préservant les connexions entre les couches IV et V du cortex somatosensoriel (S1), ainsi que le thalamus VB et le noyau réticulaire (nRT).

Afin de vérifier que les connexions entre ces différentes structures soient intactes, j'ai effectué des stimulations au niveau du thalamus VB et enregistré la réponse monosynaptique au niveau de la couche IV du cortex S1. Nous avons choisi d'appliquer des doubles stimulations (*paired-pulse*), permettant de mettre

en évidence une plasticité du réseau. En effet si la réponse à la deuxième stimulation est supérieure à la première cela reflète une facilitation, alors que dans le cas contraire cela reflète une dépression. En l'occurrence, nous n'avons constaté ni facilitation ni dépression, que ce soit pour les tranches WT ou porteuses de la mutation $Na_v1.1^{RH/+}$. J'ai ensuite enregistré simultanément les couches IV et V du cortex S1, le thalamus VB et le nRT en potentiel de champ extracellulaire. J'ai constaté des activités spontanées dans presque toutes les tranches $Na_v1.1^{RH/+}$ (16/17 tranches), alors que le ratio est bien plus faible pour les tranches WT (5/12 tranches). De plus, ces activités sont plus fréquentes dans les tranches provenant des souris $Na_v1.1^{RH/+}$ comparées aux WT. J'ai observé une synchronisation de ces activités dans les quatre structures de la boucle TC uniquement dans les tranches des souris $Na_v1.1^{RH/+}$ (dans 9 tranches sur 16). Cependant, la zone dans laquelle les décharges sont détectées en premier est variable, ne permettant pas d'impliquer une structure plutôt qu'une autre dans l'initiation de ces activités. L'amplitude et la largeur des activités qui sont synchronisées dans les 4 structures de la boucle TC est supérieure à celle des activités localisées dans une seule structure, suggérant qu'un seuil est peut être nécessaire pour permettre la transmission de ces décharges aux autres structures de la boucle TC.

Une analyse plus détaillée des activités corticales des tranches provenant des souris $Na_v1.1^{RH/+}$ a révélé des oscillations à hautes fréquences (OHF) à des gammes de fréquences considérées comme physiologiques (40-200Hz), mais également à des fréquences pathologiques (200-600Hz), car des oscillations à de telles fréquences sont observées lors d'enregistrements EEG de patients épileptiques en dehors des crises et peuvent être utilisées comme biomarqueurs pour localiser le foyer épileptique (Jefferys et al., 2012). En revanche, nous n'observons pas d'OHF sur les activités des tranches provenant des souris WT.

➤ Pour finir, nos collaborateurs ont utilisé l'imagerie calcique afin d'observer l'activité d'une population de neurones dans des tranches d'hippocampe de souris WT, hétérozygotes $Na_v1.1^{RH/+}$ et homozygotes $Na_v1.1^{RH/RH}$. Cette technique permet de capter des libérations de calcium cytosolique, principalement observables au niveau du corps cellulaire des neurones lors d'une dépolarisation, reflétant leur activité lors de décharge de PA. Nos collaborateurs ont ainsi mis en évidence une fréquence de décharge des neurones plus grande dans les tranches provenant des animaux homozygotes et hétérozygotes comparé aux WT.

Ces données montrent que les réseaux neuronaux de la boucle TC et de l'hippocampe sont spontanément plus actifs dès la période pré-épileptique pour les souris porteuses de la mutation comparés aux WT.

3. Conclusion des résultats de l'article

Nos résultats sur le modèle murin de l'EGCF+ mettent en évidence un impact de la mutation R1648H (affectant les canaux $Na_v1.1$) sur l'excitabilité neuronale dans la période pré-épileptique (P14-P20).

En effet, elle induit une réduction des décharges de PA des neurones inhibiteurs sans affecter les neurones excitateurs, révélant le rôle essentiel des canaux $Na_v1.1$ spécifiquement dans l'excitabilité des interneurons. De manière plus spécifique, il semblerait qu'au sein des neurones inhibiteurs, le SIA soit particulièrement affecté par l'altération des canaux $Na_v1.1$. Ce qui suggère une localisation de ces canaux principalement concentrée au niveau du site de génération des PA, participant à l'excitabilité des interneurons. La mutation R1648H provoque donc une réduction du contrôle inhibiteur du réseau neuronal et ce défaut d'inhibition au niveau cellulaire a pour conséquence de provoquer une hyperexcitabilité au niveau du réseau neuronal de différentes structures cérébrales (boucle TC et hippocampe). De plus, les activités corticales ont révélé avoir des propriétés spécifiques des activités épileptiques, reflétant la pertinence du modèle murin de l'EGCF+.

Syndrome de Dravet : Période pré-épileptique

Différentes approches ont également été utilisées pour étudier la période pré-épileptique sur le modèle murin du SD. D'anciennes études avaient déjà mis en évidence l'impact de la mutation KO pour le gène *Scn1a* au niveau cellulaire. En effet, tout comme pour le modèle de l'EGCF+, la mutation KO du canal $Na_v1.1$ induit une réduction des courants sodiques spécifiquement dans les neurones inhibiteurs, provoquant une perte de l'inhibition du réseau cérébral (Yu et al., 2006; Cheah et al., 2012). De plus, notre laboratoire a récemment publié un article dans lequel des enregistrements en potentiel de champ sur des tranches, prélevées en période pré-épileptique, ont révélé des signes d'hyperexcitabilité dans l'hippocampe des souris porteuses de la mutation $Na_v1.1^{+/-}$ comparé aux sauvages (WT) (Liautard et al., 2013). En effet, l'application d'une forte stimulation électrique (stimulation tétanique) au niveau des collatérales de Schaffer et l'enregistrement en potentiel de champ au niveau du *SP CA1* révèle une facilitation de la réponse pour les tranches des souris porteuses de la mutation $Na_v1.1^{+/-}$ par rapport aux souris WT dès la période pré-épileptique.

Ces données m'ont poussé à poursuivre la caractérisation de l'hyperexcitabilité observée sur les tranches Hippocampo-Corticales de jeunes souris (P15-P19), commencée par Camille Liautard.

J'ai ensuite complété ces données par des expériences réalisées *in vivo* en période pré-épileptique, tout d'abord en enregistrant l'activité cérébrale de jeunes souris anesthésiées à une température physiologique, puis en les soumettant à une augmentation de leur température corporelle (hyperthermie), reproduisant une poussée de fièvre.

Afin d'étudier l'impact de la mutation KO pour le gène *Scn1a* ($Scn1a^{+/-}$), nous avons utilisé des souris WT et le modèle murin du SD présentant la mutation hétérozygote $Na_v1.1^{+/-}$, comme celle observée chez les patients.

1. Caractérisation de l'hyperexcitabilité sur tranches Hippocampo-Corticales

- **Activité basale du réseau Hippocampo-Cortical**

Etant donné que nous avons observé des activités spontanées montrant des signes d'activités épileptiformes dans le réseau TC du modèle de l'EGCF+ en période pré-épileptique, nous nous sommes également intéressés aux activités spontanées pour le modèle murin du SD, mais dans le réseau Hippocampo-Cortical. J'ai donc prélevé des tranches de cerveau sur des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$ âgées de 15 à 19 jours, puis enregistré en potentiel de champ l'activité basale dans différentes régions de l'hippocampe et dans le CE (voir matériel & méthodes). Les électrodes d'enregistrements sont positionnées dans le *Stratum Radiata* (SR)

de l'aire CA3, et dans le SR de l'aire CA1, permettant d'enregistrer les activités au niveau des dendrites ; une autre électrode est placée au niveau du *Stratum Pyramidale* (SP) de l'aire CA1 afin d'enregistrer les activités au niveau des corps cellulaires des cellules pyramidales, et une dernière est placée au niveau de la couche IV du cortex entorhinal (CE) (Fig. 40).

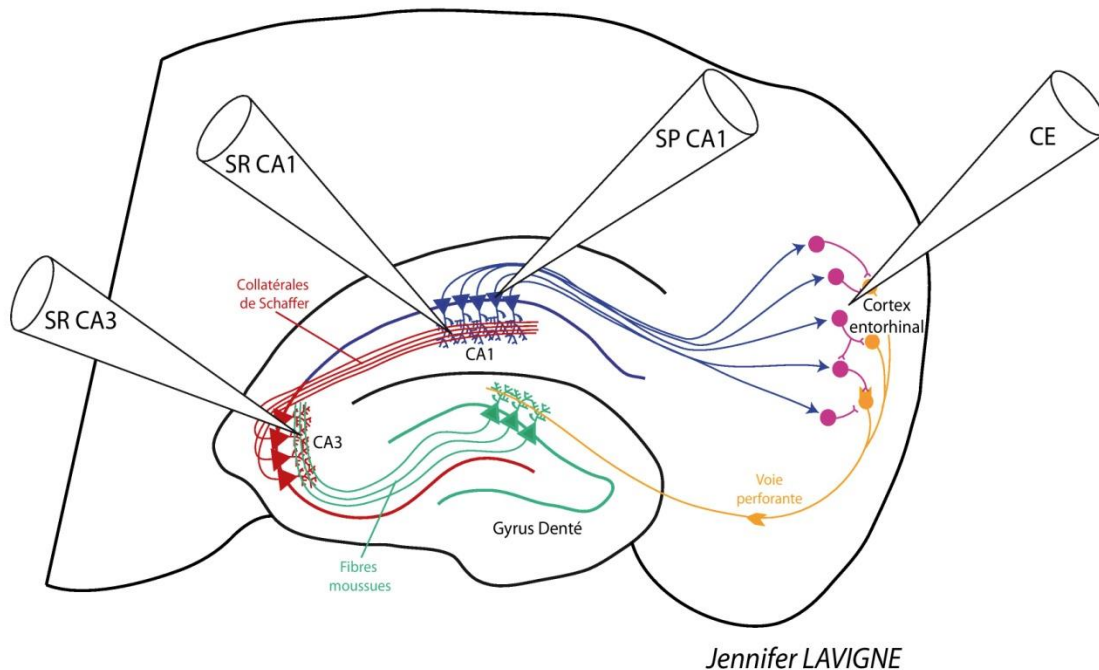


Fig. 40 : Schéma de l'enregistrement en potentiel de champ d'une coupe Hippocampo-Corticale. Une électrode est placée dans le stratum radiatum de l'aire CA3 (SR CA3), une autre est placée dans le stratum radiatum de l'aire CA1 (SR CA1), une autre est placée dans le stratum pyramidale de l'aire CA1 (SP CA1) et une dernière est placée dans la couche IV du cortex entorhinal.

Les enregistrements ont révélé des activités spontanées en pointes, appelées « *sharp waves* », dans l'hippocampe des souris WT et des souris $Na_v1.1^{RH/+}$ mais pas d'activités détectables au niveau du cortex entorhinal (WT: N=6, 12 tranches ; $Na_v1.1^{+/-}$: N=6, 12 tranches) (Fig. 41A). Ces « *sharp waves* » sont générées dans le SR CA3 (Buzsáki, 2015) et sont détectables dans les 3 structures enregistrées dans l'hippocampe, cependant elles apparaissent plus clairement et de manière plus reproductible au niveau du SR CA1, nous avons donc choisi d'effectuer l'analyse de ces activités uniquement dans cette structure. Ainsi, après avoir analysé les composantes de fréquence, de durée et d'amplitude des « *sharp waves* », je n'ai pas distingué de différence dans la fréquence (Fig. 41B) ou la longueur de ces activités (Fig. 41C) pour les tranches provenant des souris WT et $Na_v1.1^{RH/+}$. En revanche, bien que les amplitudes ne donnent pas d'information précise dans

Partie I : Etude de l'épileptogénèse

SD : Période pré-épileptique

les enregistrements en potentiel de champ, puisque le nombre de neurones environnant enregistré est aléatoire, il semblerait tout de même que l'amplitude des spikes soit significativement plus grande dans les tranches des souris $Nav1.1^{+/-}$ comparées aux WT (WT = $0,19 \pm 0,02$ mV ; $Nav1.1^{+/-}$ = $0,38 \pm 0,02$ mV / *test U de MannWhitney* $**p = 4.10^{-4}$) (Fig. 41D), suggérant une forme d'hyperexcitabilité.

Les graphiques utilisés dans la figure 41B, C et D sont des boîtes à moustaches ou « *Box plots* », représentant les quartiles (divise les valeurs en 4 parts égales : 25%, 50%, 75% et 100%) et la médiane. Ce type de graphiques sera utilisé par la suite dans d'autres analyses.

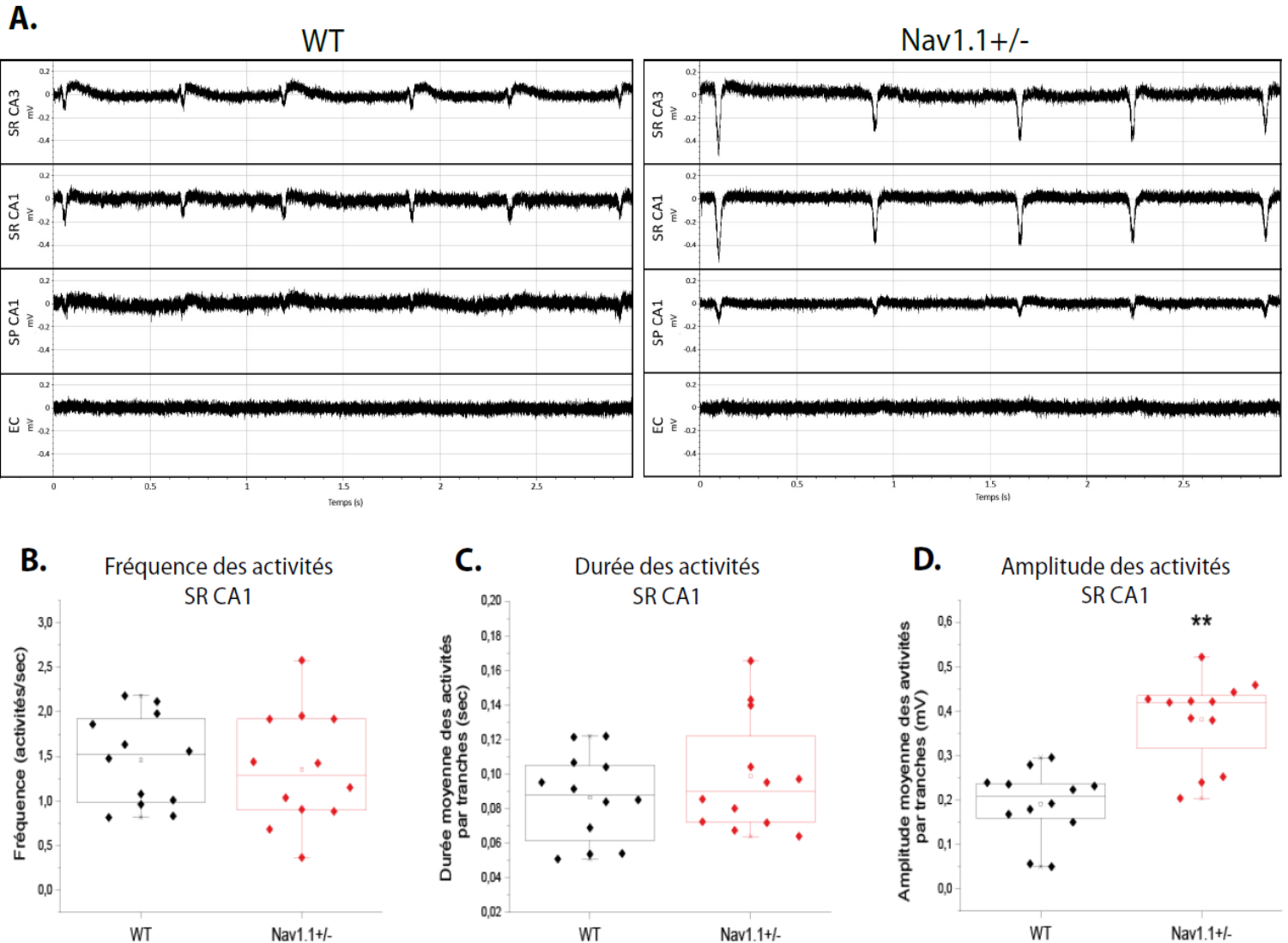


Fig. 41 : Enregistrement en potentiel de champ des activités spontanées (sharp waves) dans des tranches Hippocampo-Corticales des souris WT et $Nav1.1^{+/-}$ âgées de 15 à 19 jours. A) Exemple représentatif des activités spontanées (potentiels de champ) enregistrées au cours du temps dans le SR CA3, le SR CA1, Le SP CA1 et le cortex entorhinal (EC) dans une tranche de souris WT (gauche) et de souris $Nav1.1^{+/-}$ (droite). B, C) et D) Box plots représentant les quartiles (divise les valeurs en 4 parts égales : 25%, 50%, 75% et 100%) et la médiane des valeurs. B) Box plots des fréquences des activités spontanées dans le SR CA1. C) Box plots de la moyenne des durées des activités spontanées par tranche dans le SR CA1. D) Box plots de la moyenne des amplitudes par tranche des activités spontanées dans le SR CA1.

Tout comme pour les activités spontanées observées dans les tranches du modèle de l'EGCF+, j'ai analysé plus en détail les OHF des activités enregistrées dans le SR CA1 des tranches des souris WT et Nav1.1^{+/-}. J'ai donc filtré les traces selon des gammes de fréquences physiologiques (40-200Hz), permettant la détection de « ripples » et pathologiques, permettant la détection de « fast ripples » représentatives des activités observées dans des foyers épileptiques (200-600Hz). Cependant, bien que nous ayons constaté des « ripples » physiologiques la fois dans le SR CA1 des tranches WT et Nav1.1^{+/-} sans différences entre les deux groupes (Aire des OHF filtrées à 40-200Hz WT : 0,15±0,01 ; Nav1.1^{+/-} : 0,14±0,01), nous ne constatons pas de « fast ripples » pathologiques ni pour les tranches WT ni celles porteuses de la mutation (Aire des OHF filtrées à 200-600Hz WT : 0,01±0,01 ; Nav1.1^{+/-} : 0,01±0,02) (Fig. 42). Ces données suggèrent que bien que l'on constate une forme d'hyperexcitabilité dans l'hippocampe des souris mutantes comparées aux WT, les activités ne possèdent pas les caractéristiques pathologiques évidentes des activités épileptiformes.

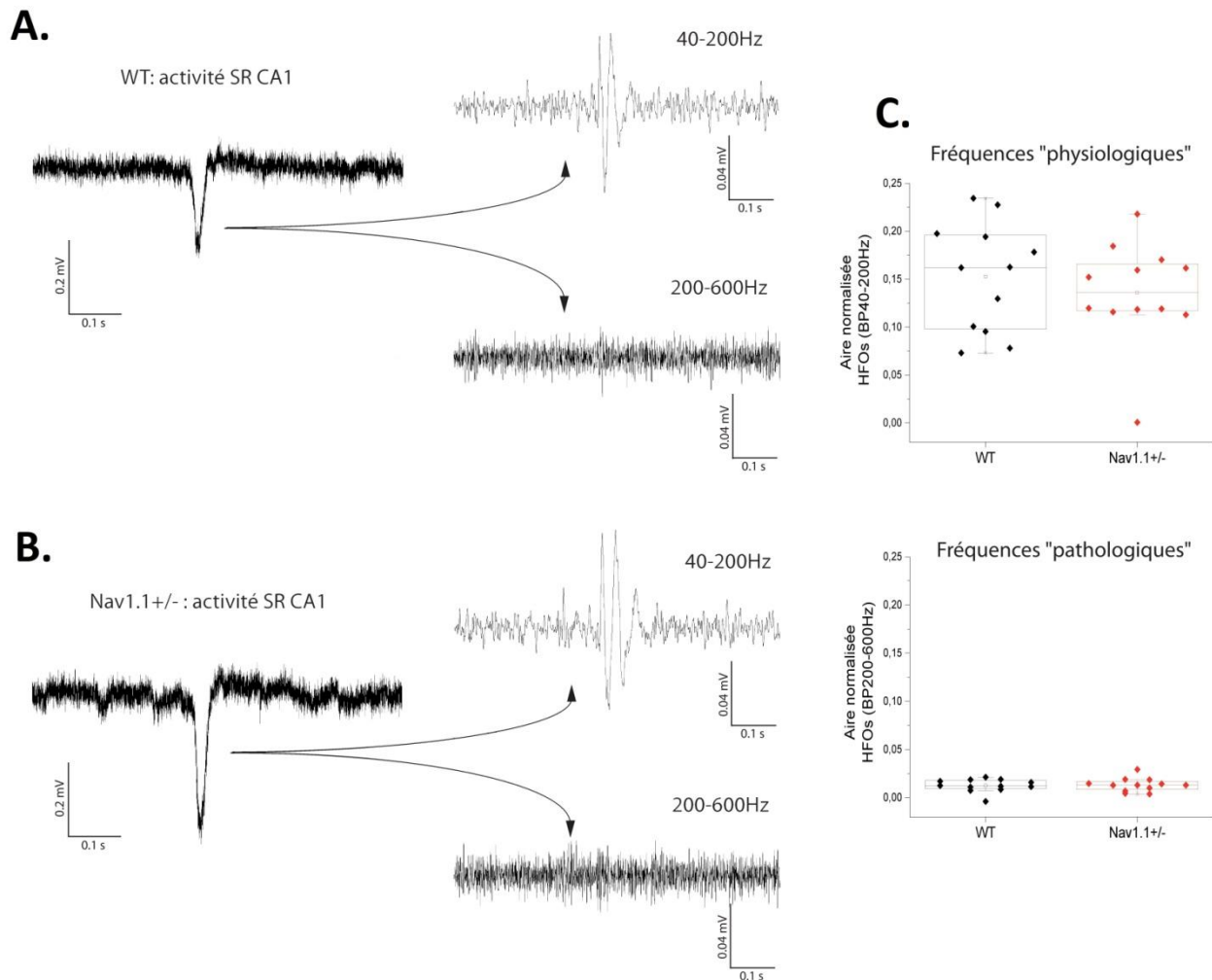


Fig. 42 : Analyse des Oscillations Haute Fréquences (OHF) des activités spontanées enregistrées dans le SR CA1.

A) Exemple représentatif d'une activité provenant du SR CA1 d'une souris WT filtrée entre 40 et 200 Hz (ripples), et filtrée entre 200 et 600 Hz (fast ripples). B) Exemple représentatif d'une activité provenant du SR CA1 d'une souris Nav1.1^{+/-} filtrée entre 40 et 200 Hz, et filtrée entre 200 et 600 Hz. C) Box plots des aires normalisées des activités spontanées aux fréquences physiologiques (40-200 Hz) et pathologiques (200-600 Hz). L'aire des OHF est normalisée en enlevant le bruit potentiel et par rapport à l'aire des activités spontanées non filtrées (se référer au matériel & méthodes).

Ces données sont en accord avec l'idée que la mutation hétérozygote KO du gène *Scn1a*, qui provoque une altération de l'activité des neurones GABAergiques et une perte d'inhibition cérébrale, favorise l'hyperexcitabilité de l'hippocampe pour les souris Nav1.1^{+/-} en période pré-épileptique, bien que celle-ci ne possède pas de caractéristiques des activités épileptiformes.

- **Hyperexcitabilité induite de l'hippocampe en période pré-épileptique**

L'hyperexcitabilité spontanée dans l'hippocampe des tranches du modèle murin de SD n'étant pas aussi évidente que dans le réseau TC du modèle GEFS+, notre étudiant de master, Renaud Bussière et moi-même avons décidé de poursuivre les expériences initiées par « [Liautard et al., 2013](#) » qui consistaient à appliquer une forte stimulation électrique au niveau du réseau de l'hippocampe afin de provoquer une hyperexcitabilité que nous pouvons comparer dans les tranches Nav1.1^{+/-} et WT.

➤ Dans un premier temps, afin de vérifier que les connexions du réseau hippocampique soient intactes et de trouver les meilleures conditions de stimulation (emplacement, intensité de stimulation), nous avons placé l'électrode de stimulation au niveau des collatérales de Schaffer pour analyser la courbe de réponse, appelée « input-output », des neurones à différentes intensités de courant, grâce à une électrode d'enregistrement placée au niveau du *stratum pyramidale* (SP). Les neurones pyramidaux de l'aire CA1 recevant la stimulation vont donc y répondre en déchargeant et la sommation des PA des neurones proches de l'électrode donnera un signal appelé « population spike » (PS) (Fig. 43A). Nous n'avons pas constaté de différence dans les courbes « input-output » des tranches provenant des souris WT et Nav1.1^{+/-} (WT = 9 tranches, Nav1.1^{+/-} = 12 tranches ; 1 tranche par souris) (Fig. 43B). Pour la suite de l'expérience, nous avons utilisé l'intensité de stimulation donnant une réponse maximale des neurones pyramidaux.

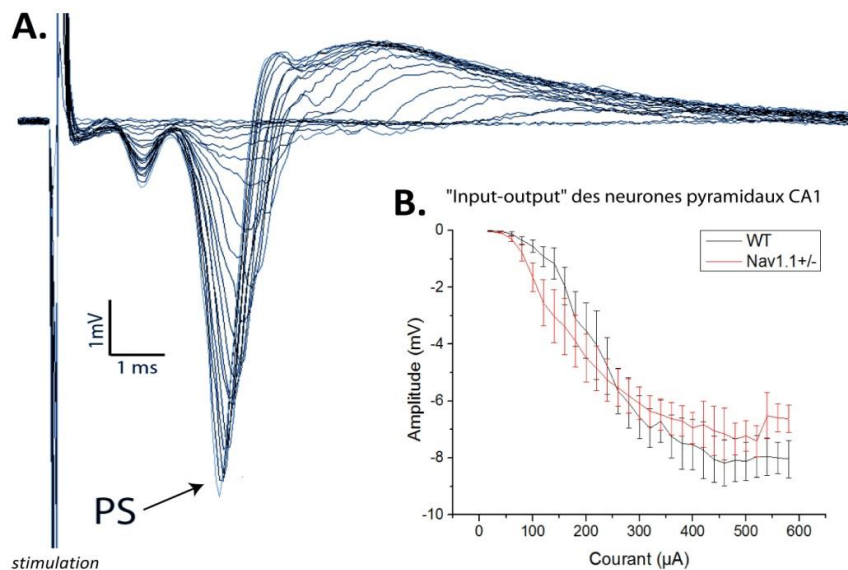


Fig. 43 : Réponse des neurones pyramidaux CA1 suite aux stimulations électriques croissantes au niveau des collatérales de Schaffer. A) Exemple représentatif des « population spikes » (PS) générés par les neurones pyramidaux proches de l'électrode en réponse aux injections de courant d'intensité croissante au niveau des collatérales de Schaffer. B) Courbe « input-output » de la moyenne des amplitudes des PS en fonction du courant administré pour les tranches des souris WT et Nav1.1^{+/-} prélevées entre P15-19. (WT N : 9 tranches, Nav1.1^{+/-} N = 12 tranches, 1 tranche par souris)

➤ Nous avons choisi d'appliquer une intense stimulation électrique, appelée « stimulation tétanique », afin d'observer l'excitabilité du réseau neuronal. En effet, une telle stimulation provoque une bouffée de PA qui se suivent étroitement. Chaque PA provoque la libération de neurotransmetteurs due à l'accumulation pré-synaptique de Ca^{2+} ; lors du PA suivant du Ca^{2+} s'ajoute à celui de l'impulsion précédente, augmentant ainsi la libération des neurotransmetteurs. Ce phénomène de plasticité est appelé « potentialisation tétanique » et peut varier en fonction de l'excitabilité du réseau.

Nous avons donc effectué une stimulation tétanique (100Hz) au niveau des collatérales de Schaffer et enregistré la réponse au niveau du SP (même positionnement des électrodes que pour la courbe « input-output »). La réponse, composée d'une bouffée de pics (correspondant aux bouffées de PA de plusieurs neurones proches de l'électrode d'enregistrement), est appelée « *afterdischarge* » ou « décharges post-tétaniques » (Fig. 44A).

L'étude des différents paramètres de décharges post-tétaniques a révélé plusieurs différences significatives dans les réponses post-tétaniques enregistrées dans l'hippocampe des tranches provenant des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$. En effet, la latence entre le stimulus tétanique et le début de la réponse est plus courte dans l'hippocampe des souris porteuses de la mutation comparé aux contrôles (WT : 105 ± 12 ms, $Na_v1.1^{+/-}$: 68 ± 11 ms ; *test U de MannWhitney* $*p = 0,04$) (Fig. 44B) et la durée de l'*afterdischarge* est significativement plus longue dans les tranches des souris hétérozygotes comparé aux WT (WT : 224 ± 56 ms, $Na_v1.1^{+/-}$: 515 ± 62 ms ; *test U de MannWhitney* $**p = 5.10^{-3}$) (Fig. 44C). De plus le nombre de pointes composant l'*afterdischarge* est significativement plus important dans les tranches $Na_v1.1^{+/-}$ comparé aux WT (WT : 23 ± 5 pointes, $Na_v1.1^{+/-}$: 48 ± 5 pointes ; *test U de MannWhitney* $**p = 4.10^{-3}$) (Fig. 44D), similairement aux données obtenues dans l'article de « Liutard et al., 2013 ». Les amplitudes maximales des pointes sont également plus grandes pour les tranches des souris hétérozygotes $Na_v1.1^{+/-}$ comparé aux WT (WT : $0,6 \pm 0,1$ mV, $Na_v1.1^{+/-}$: $1,9 \pm 0,3$ mV ; *test U de MannWhitney* $**p = 3.10^{-3}$) (Fig. 44E).

Le réseau hippocampique dans les tranches de cerveau des souris possédant une mutation hétérozygote invalidante du gène *Scn1a* possède donc une hyperexcitabilité induite plus importante que les tranches des souris contrôles durant la période pré-épileptique.

Ces résultats suggèrent donc que dans le modèle murin du SD durant la période précédant l'apparition des crises, on observe déjà des activités spontanées d'amplitude plus importante que pour les souris WT, mais on dénote surtout une plus grande sensibilité au déclenchement de l'hyperexcitabilité dans l'hippocampe.

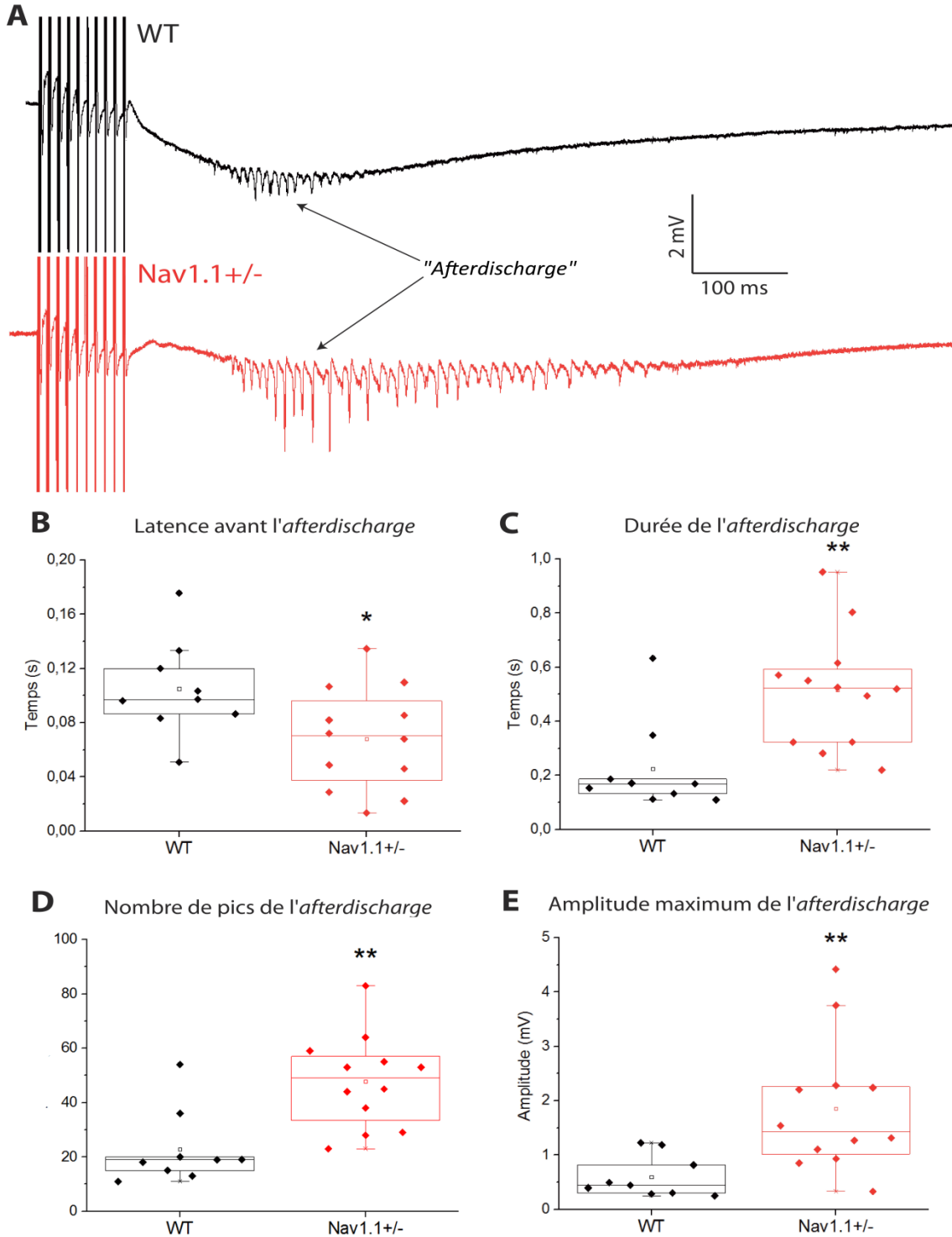


Fig. 44 : Réponse des neurones pyramidaux CA1 suite à une stimulation électrique téтанique au niveau des collatérales de Schaffer. A) Exemple représentatif des « afterdischarges » générées en réponse à une stimulation téтанique dans une tranche provenant d'une souris WT et d'une souris Nav1.1^{+/-} prélevées entre P15-19. B) Box plots des latences entre la stimulation et le début des « afterdischarges ». C) Box plots des durées des « afterdischarges ». D) Box plots du nombre de pics composant les « afterdischarges ». E) Box plots des amplitudes du pic le plus grand à l'intérieur des « afterdischarges ». (WT N : 9 tranches, Nav1.1^{+/-} N = 12 tranches, 1 tranche par souris)

2. Effet de la CCK sur l'hyperexcitabilité de l'hippocampe en période pré-épileptique

La Cholecystokinine (CCK) est un peptide permettant de réguler la prise alimentaire au niveau gastro-intestinal, mais elle est également présente au niveau du cerveau. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, ce peptide libéré par les interneurons CCK+, exerce un effet excitateur sur les interneurons Parvalbumine (PV+) (Földy et al., 2007; Lee et al., 2011) qui sont fortement impactés par la troncation du gène *Scn1a* (Ogiwara et al., 2007). De plus, des résultats préliminaires obtenus par d'autres membres du laboratoire ont montré que, dans le modèle murin du SD, bien que l'on ait une diminution de l'excitabilité des interneurons PV+, on a en revanche une surprenante augmentation de l'excitabilité des interneurons CCK+ caractérisée par une augmentation de l'amplitude des PA dans des enregistrements de *patch-clamp* réalisés sur tranches d'hippocampe (*non montrés*). Nous supposons que l'hyperexcitabilité des interneurons CCK+ puisse être due à des mécanismes de compensation ayant pour but de tenter de contrebalancer l'hypoexcitabilité des autres interneurons en augmentant l'effet excitateur sur les interneurons PV+. Nous avons donc émis l'hypothèse que la CCK pourrait potentialiser l'activité des neurones PV+, initialement perturbée par la mutation KO du gène *Scn1a*, et réduire l'hyperexcitabilité observée dans les tranches d'hippocampe des souris $Na_v1.1^{+/-}$.

Nous avons évalué l'effet de l'administration de CCK sur l'excitabilité induite dans l'hippocampe. Pour cela, les tranches de cerveau Hippocampo-Corticales des souris $Na_v1.1^{+/-}$ et WT ont été perfusées avec une solution contenant 100µM de CCK et l'effet de ce traitement sur les décharges post-tétaniques a été analysé à différents temps (voir matériel & méthodes).

La courbe « input-output » a été réalisée comme précédemment sur les tranches des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$ (WT = 5 tranches, $Na_v1.1^{+/-}$ = 7 tranches ; 1 tranche par souris) et l'intensité de courant permettant une réponse optimale a été utilisée pour effectuer des stimulations tétaniques avant administration de la CCK, puis après 1h, 1h30 et 2h de perfusion avec 100µM de CCK.

De manière intéressante, les résultats obtenus après 2h de traitement avec la CCK montrent une réduction significative de la durée de la réponse post-tétanique pour les tranches provenant des souris $Na_v1.1^{+/-}$ ($Na_v1.1^{+/-}$ T=0: 600±90 ms ; T=2h : 349±80 ms ; *test U de MannWhitney* $p^* = 0,04$), au point de ne plus avoir de différence avec la durée de réponse dans les tranches WT ($Na_v1.1^{+/-}$ T=2h : 349±80 ms ; WT T=2h ; 289±25 ms) (Fig. 45B).

Il en est de même avec le nombre de pics contenus dans l'*afterdischarge*, qui est réduit significativement au cours du traitement dans les réponses des souris mutantes ($Na_v1.1^{+/-}$ T=0: 57±5 pics ; T=2h : 29±8 pics ; *test U de MannWhitney* $p^* = 0,01$), pour atteindre le même nombre que dans les réponses des souris contrôles ($Na_v1.1^{+/-}$ T=2h : 29±8 pics ; WT T=2h : 29±8 pics) (Fig. 45C).

Nous ne constatons aucune variation dans les paramètres de réponse des tranches WT au cours du temps de traitement avec la CCK. La latence semble ne pas varier non plus pour les tranches $Na_v1.1^{+/-}$ (Fig. 45A) et en ce qui concerne l'amplitude, bien qu'il semble y avoir une réduction de la taille maximale des pics enregistrés

dans l'hippocampe des souris porteuses de la mutation au cours du temps de traitement, elle n'est pas significative (Fig. 45D).

Des expériences contrôles sans administration de CCK ont également permis de vérifier que le temps d'incubation des tranches n'avait pas d'effet sur les réponses post-tétaniques (résultats non montrés).

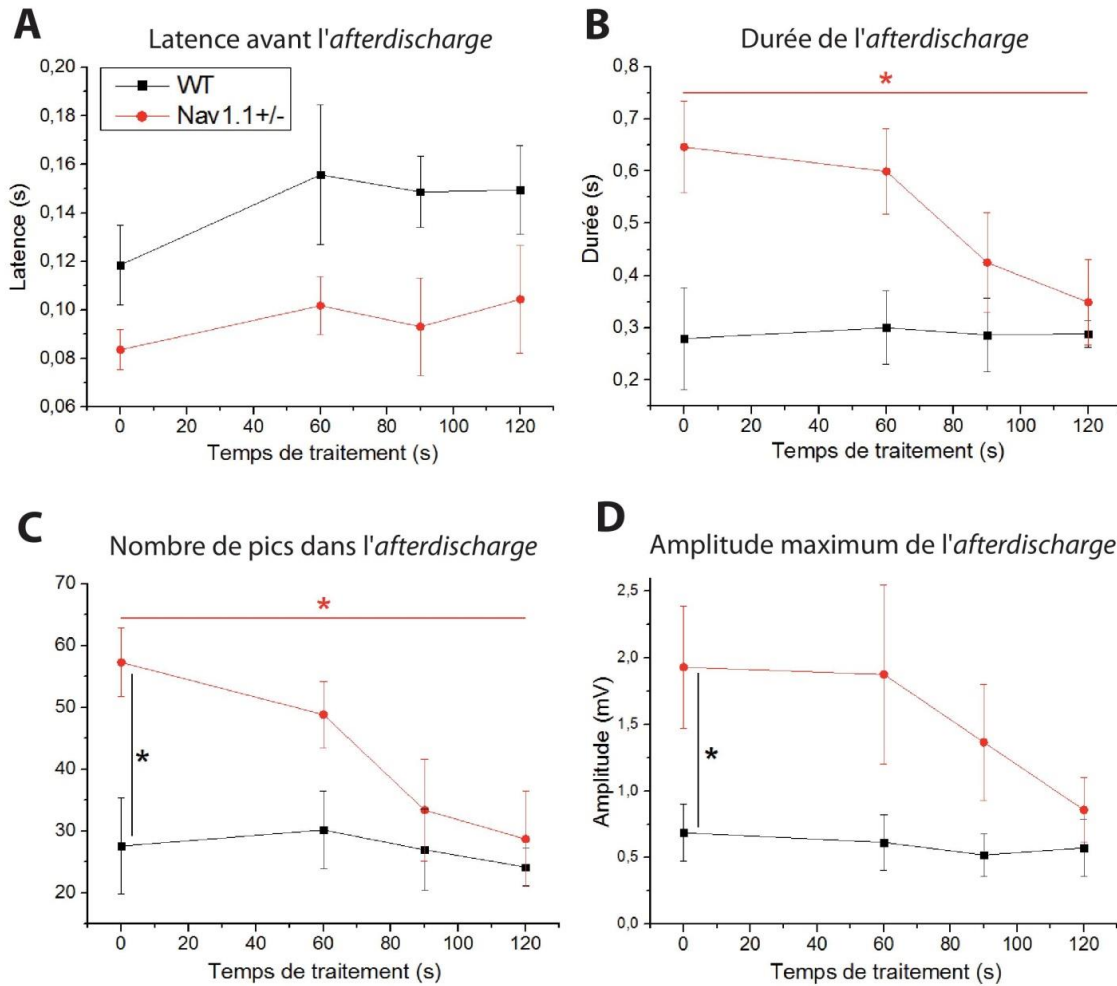


Fig. 45 : Effet de la Cholecystokinine (CCK-8S) sur les « afterdischarges » enregistrées dans le stratum pyramidale CA1 suite à une stimulation téτανique au niveau des collatérales de Schaeffer. A) Courbes des latences moyennes entre la stimulation et « l'afterdischarge » en fonction du temps de traitement avec la CCK-8S. B) Courbes des durées moyennes des « afterdischarges » en fonction du temps de traitement. C) Courbes de la moyenne du nombre de pics dans les « afterdischarges » en fonction du temps de traitement. D) Courbes de la moyenne des amplitudes maximums des « afterdischarge » en fonction du temps de traitement. (WT N : 9 tranches, Nav1.1^{+/-} N = 12 tranches, 1 tranche par souris)

Ces résultats montrent que la CCK permet de restaurer l'hyperexcitabilité induite à un niveau physiologique dans l'hippocampe du modèle murin du SD durant la période pré-épileptique.

3. Etude du réseau Hippocampo-Cortical *in vivo*

Nous avons choisi de poursuivre l'investigation du réseau Hippocampo-Cortical sur un modèle plus intégré en enregistrant l'activité de l'hippocampe et du cortex *in vivo* en potentiel de champ, sur des souris anesthésiées à l'uréthane (voir matériel et méthodes). En effet l'uréthane, utilisé dans de nombreuses études sur l'épilepsie (Campbell and Holmes, 1984; Velíšková et al., 1991; Stringer and Sowell, 1994; Khazipov and Holmes, 2003; Canan et al., 2008; Slais et al., 2008; de Guzman et al., 2010; Hotta et al., 2010), mime l'état de sommeil lent enregistré par EEG (Clement et al., 2008). Nous nous sommes basés sur l'article de « Stasi et al., 2016 » réalisé sur le même modèle murin que le nôtre en période pré-épileptique, qui n'a pas révélé de différence entre les activités enregistrées en potentiel de champ au niveau du cortex des souris $Na_v1.1^{+/-}$ et WT (Stasi et al., 2016). Cependant, nous pouvons supposer que la mutation pouvait entraîner une altération de l'activité au niveau de l'hippocampe, puisque dans nos expériences et dans l'étude de « Liautard et al., 2013 » nous avons vu une hyperexcitabilité dans cette structure sur les enregistrements en tranche en période pré-épileptique et des activités pré-ictales précoces dans l'hippocampe lors d'enregistrements *in vivo*.

L'activité de l'hippocampe et du cortex des souris âgées de 16 à 19 jours a été enregistrée et analysée à la température corporelle physiologique de 37°C et la température fébrile de 41°C. L'enregistrement du cortex nous a servi de contrôle afin de voir si nous obtenions les mêmes résultats que ceux de l'article de « Stasi et al., 2016 ». La fréquence respiratoire a été contrôlée durant toute la durée de l'expérience (WT = 10 souris, $Na_v1.1^{+/-}$ = 10 souris).

A la fin de l'enregistrement, nous avons appliqué une longue stimulation (60s, 40µA) provoquant une brûlure, afin de marquer la zone d'enregistrement de l'hippocampe et d'effectuer des tranches pour vérifier la localisation de l'électrode. Dans toutes les tranches dont les activités ont été analysées, l'électrode était localisée au niveau du *Stratum Radiatum* (SR) entre la zone CA1 et le gyrus denté (Fig. 46).

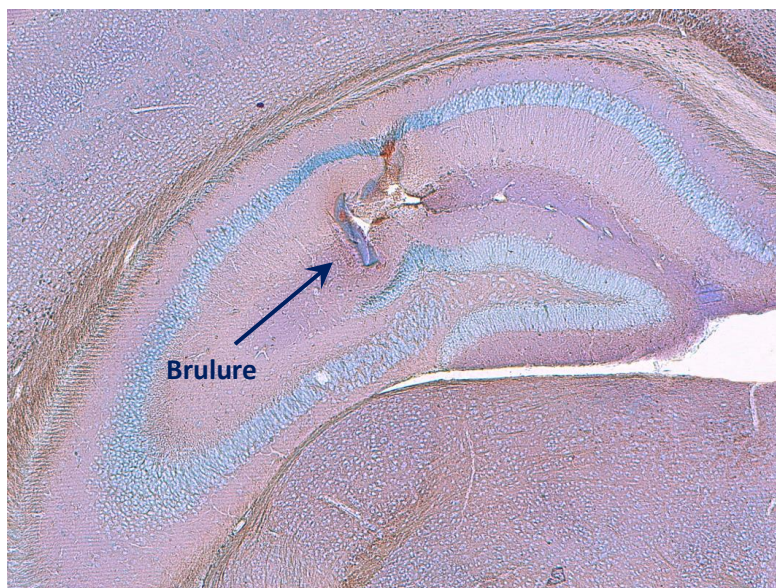


Fig. 46 : Photo (x4) représentative de la zone d'enregistrement en potentiel de champ dans l'hippocampe des souris âgées de 16 à 19 jours. Une longue stimulation électrique (60s à 40µA) a permis de brûler la zone où l'électrode était implantée : au niveau du stratum radiatum CA1.

Tout comme dans l'article de « [Stasi et al., 2016](#) », nous observons des activités spontanées dans le cortex des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$ et nous observons également des activités spontanées dans l'hippocampe des deux groupes de souris qui sont synchronisées avec les activités du cortex ([Fig. 47](#)). Les activités détectées dans l'hippocampe ont toujours une composante négative alors que les activités enregistrées dans le cortex ont principalement une composante positive.

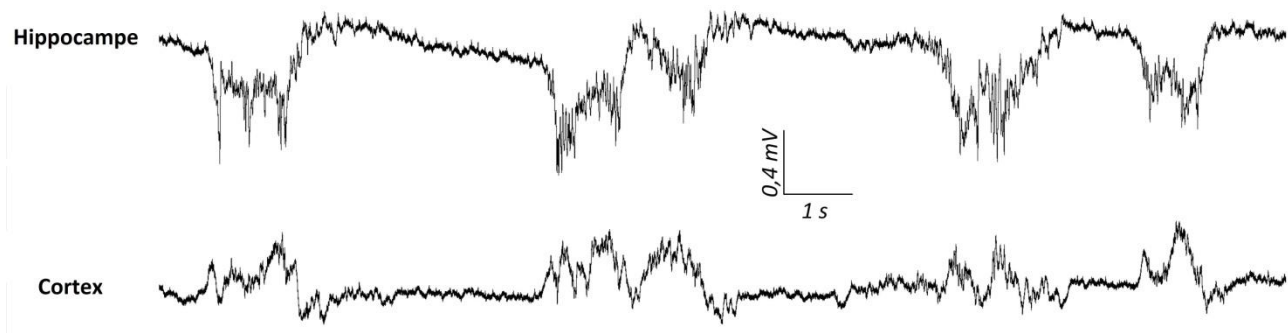


Fig. 47 : Exemple représentatif des activités spontanées enregistrées in vivo en potentiel de champ dans l'hippocampe et le cortex des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$. Les activités détectées dans l'hippocampe sont synchrones avec les activités détectées dans le cortex. WT N = 15souris / $Nav1.1^{+/-}$ N = 15 souris

Aucune variation significative de la fréquence respiratoire des animaux n'a été observée entre la température physiologique (37°C) et l'augmentation de la température corporelle à 41°C que ce soit pour les souris WT (37°C : $3,5 \pm 0,08$ Hz ; 41°C : $3,8 \pm 0,15$ Hz ; test t de Student > 0,05) ou porteuses de la mutation (37°C : $3,3 \pm 0,12$ Hz ; 41°C : $3,6 \pm 0,08$ Hz ; test t de Student > 0,05), reflétant la stabilité des signes vitaux des animaux.

Comme nous l'espérions, dans le cortex nous n'observons aucune différence entre les activités spontanées des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$ à la température physiologique de 37°C, similairement aux données publiées par « [Stasi et al., 2016](#) », et nous n'avons distingué aucune différence dans les mêmes paramètres entre les deux groupes de souris lorsque la température est augmentée à 41°C (résultats non présentés).

Dans l'hippocampe, lorsque l'on compare les paramètres des activités des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$ à 37°C, nous n'observons pas de différence dans les différents paramètres analysés des activités spontanées (aire, durée, amplitude et fréquence). Nous n'observons pas non plus de différence de ces paramètres pour les activités des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$ enregistrées à 41°C (test t de student > 0.05 ; se référer au tableau de la [figure 48](#)).

Nous n'observons aucune variation significative de ces paramètres pour les souris WT lorsqu'on augmente leur température corporelle de 37 à 41°C (test t de student > 0.05 ; se référer au tableau de la [figure 48](#) et à la [figure 49 A à D](#)). Il en est de même pour les souris porteuses de la mutation $Na_v1.1^{+/-}$, pour lesquelles l'augmentation de la température corporelle n'induit pas de variation des activités enregistrées dans l'hippocampe (test t de student > 0.05 ; se référer au tableau de la [figure 48](#) et à la [figure 49 E à H](#)).

Partie I : Etude de l'épileptogenèse

SD : Période pré-épileptique

	WT (N=10 souris)		Nav1.1 ^{-/-} (N=10 souris)	
	37°C	41°C	37°C	41°C
Aire (ms.mV)	407.42 ± 56.18	431.64 ± 45.82	464.93 ± 69.2	534.96 ± 94.07
Durée (ms)	1108.97 ± 95.54	1136.87 ± 100.71	1196.51 ± 97.88	1247.87 ± 115.01
Amplitude (mV)	0.889 ± 0.094	0.874 ± 0.064	0.937 ± 0.109	0.982 ± 0.122
Fréquence (Hz)	0.3531 ± 0.0293	0.362 ± 0.0288	0.449 ± 0.0583	0.4133 ± 0.0508

Fig. 48 : Tableau statistique de l'analyse des différents paramètres des activités spontanées enregistrées dans l'hippocampe des souris WT et Nav1.1^{-/-} âgées de 16 à 19 jours. Moyenne de différents paramètres ± erreur standard : l'aire des activités (qui est proportionnelle à la durée et l'amplitude), la durée exprimée en ms, l'amplitude exprimée en mV et la fréquence exprimée en Hertz (Hz). Les résultats sont montrés pour les souris WT (N = 10) et les souris Nav1.1^{-/-} (N = 10) à la température physiologique de 37°C et à la température fébrile de 41°C.

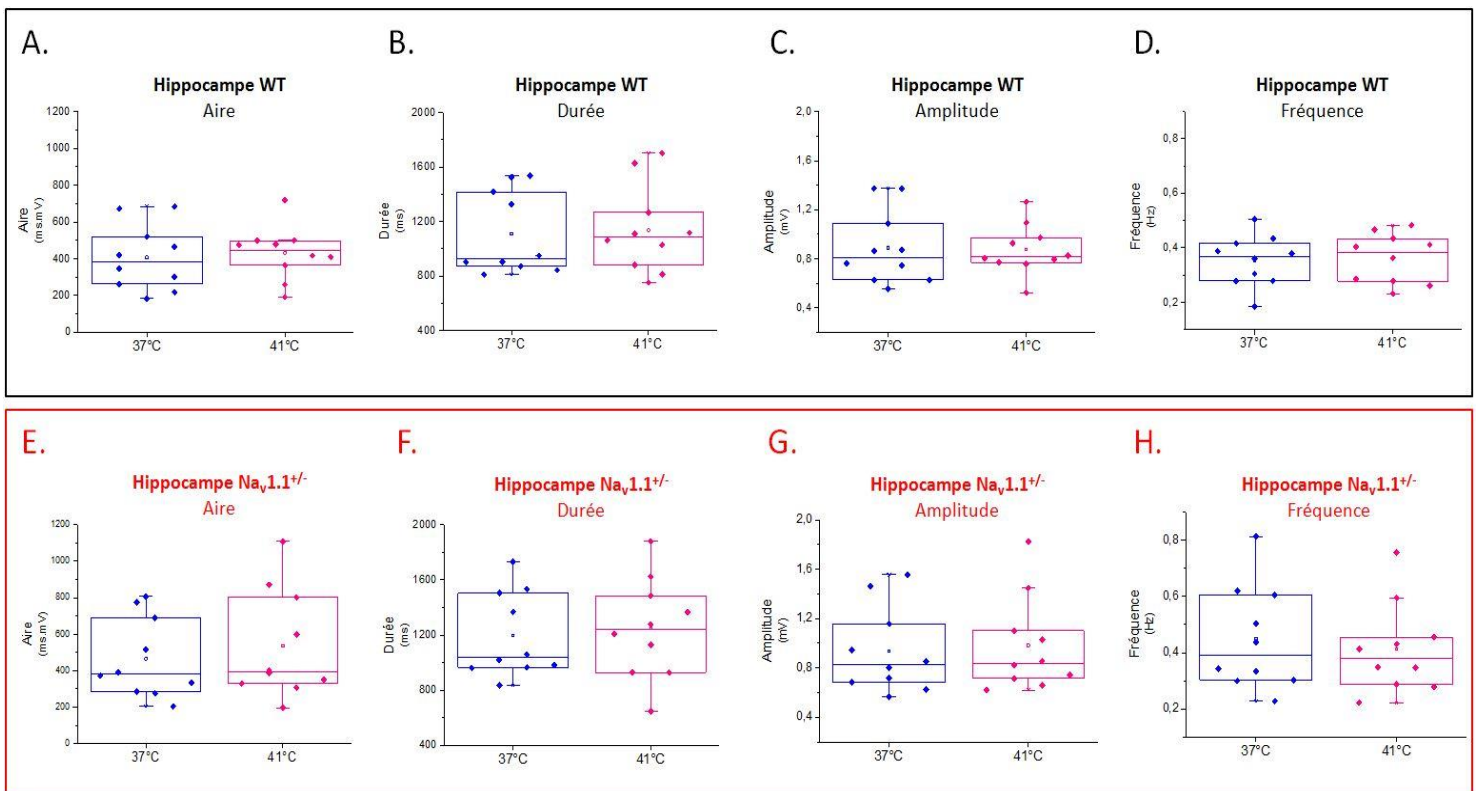


Fig. 49 : Box Plots représentant les différents paramètres analysés pour les activités spontanées enregistrées dans l'hippocampe des souris WT et Nav1.1^{-/-} âgées de 16 à 19 jours. Box Plots bleus : température corporelle à 37°C ; Box Plots roses : température corporelle à 41°C / Haut : Représentation de l'analyse de l'aire, la durée, l'amplitude et la fréquence des activités spontanées enregistrées dans les hippocampes des souris WT en fonction de l'augmentation de la température corporelle de 37 à 41°C / Bas : Représentation de l'analyse de l'aire, la durée, l'amplitude et la fréquence des activités spontanées enregistrées dans les hippocampes des souris Nav1.1^{-/-} en fonction de l'augmentation de la température corporelle de 37 à 41°C. WT N = 10 souris, Nav1.1^{-/-} N = 10 souris.

Les analyses du spectre de puissance (répartition de la puissance de ces activités en fonction de différentes bandes de fréquence) ne montrent pas de différence lorsqu'on compare les activités des souris WT et des souris $Na_v1.1^{+/-}$ dans le cortex et dans l'hippocampe que ce soit à 37°C et à 41°C (test U de *Mann Whitney* > 0.05 et test de *Kolmogorov-Smirnov* > 0.05 ; se référer au tableau de la [figure 50](#)).

L'effet de l'augmentation de la température corporelle a été analysé sur le spectre de puissance de chaque groupe d'animaux dans le cortex et dans l'hippocampe. Ainsi dans le cortex nous n'avons pas constaté de différence significative à 37°C et à 41°C pour les spectres de puissance des souris WT analysés aux différents intervalles de fréquences, tout comme pour les souris $Na_v1.1^{+/-}$ (test U de *Mann Whitney* > 0.05 et test de *Kolmogorov-Smirnov* > 0.05 ; se référer au [tableau A. de la figure 50](#)), ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans l'article de « [Stasi et al., 2016](#) ». Au niveau de l'hippocampe, nous n'avons pas non plus constaté de différences significatives (test U de *Mann Whitney* > 0.05 et test de *Kolmogorov-Smirnov* > 0.05 ; se référer au [tableau B. de la figure 50](#)) entre les spectres de puissance analysés à 37°C et à 41°C pour les souris WT représentés entre 0.1 et 100 Hz ([Fig. 51A](#)), entre 100 et 200 Hz ([Fig. 51B](#)) et entre 200 et 300 Hz ([Fig. 51C](#)), tout comme pour les souris $Na_v1.1^{+/-}$ ([Fig. 51 D, E et F](#)).

A.	Bande de fréquences (Hz)	Cortex			
		WT (N=10 souris)		$Na_v1.1^{+/-}$ (N=10 souris)	
		37°C	41°C	37°C	41°C
		0.5-1	0.26259 ± 0.03484	0.37057 ± 0.04577	0.20021 ± 0.04044
2-4	0.03673 ± 0.00538	0.04251 ± 0.00780	0.02895 ± 0.00550	0.04806 ± 0.00686	
4-8	0.00996 ± 0.00164	0.01520 ± 0.00339	0.00681 ± 0.00138	0.01231 ± 0.00187	
8-14	0.00317 ± 0.00047	0.00321 ± 0.00055	0.00214 ± 0.00041	0.00320 ± 0.00058	
30-90	0.00019 ± 0.00003	0.00018 ± 0.00004	0.00011 ± 0.00002	0.00015 ± 0.00003	
100-200	0.01001 ± 0.00001	0.01001 ± 0.00001	0.01002 ± 0.00002	0.01003 ± 0.00001	
200-300	0.01003 ± 0.00001	0.01002 ± 0.00001	0.01004 ± 0.00001	0.01001 ± 0.00001	

B.	Bande de fréquences (Hz)	Hippocampe			
		WT (N=15 souris)		$Na_v1.1^{+/-}$ (N=15 souris)	
		37°C	41°C	37°C	41°C
		0.5-1	0.33453 ± 0.03614	0.45038 ± 0.05076	0.29875 ± 0.03505
2-4	0.02452 ± 0.00406	0.03039 ± 0.00528	0.01659 ± 0.00206	0.02698 ± 0.00467	
4-8	0.00626 ± 0.00115	0.01444 ± 0.00300	0.00502 ± 0.00059	0.01063 ± 0.00276	
8-14	0.00316 ± 0.00057	0.00432 ± 0.00086	0.00244 ± 0.00034	0.00340 ± 0.00063	
30-90	0.00028 ± 0.00005	0.00039 ± 0.00006	0.00031 ± 0.00005	0.00035 ± 0.00006	
100-200	0.01002 ± 0.00001	0.01001 ± 0.00001	0.01003 ± 0.00001	0.01002 ± 0.00001	
200-300	0.01003 ± 0.00001	0.01001 ± 0.00001	0.01002 ± 0.00001	0.01002 ± 0.00001	

Fig. 50 : Tableau statistique de l'analyse des puissances normalisées des activités en fonction de différentes bandes de fréquences. A) Puissances normalisées des potentiels enregistrés dans le cortex des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$ aux températures corporelles de 37°C et 41°C. B) Puissances normalisées des potentiels enregistrés dans les hippocampes des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$ aux températures corporelles de 37°C et 41°C. Les puissances sont exprimées en Unités arbitraires ± Erreur standard et sont analysées dans différences bandes de fréquences : 0.5 à 1 Hz, 2 à 4 Hz, 4 à 8Hz, 8 à 14 Hz, 30 à 90 Hz, 100 à 200 Hz et 200 à 300 Hz.

Partie I : Etude de l'épileptogenèse

SD : Période pré-épileptique

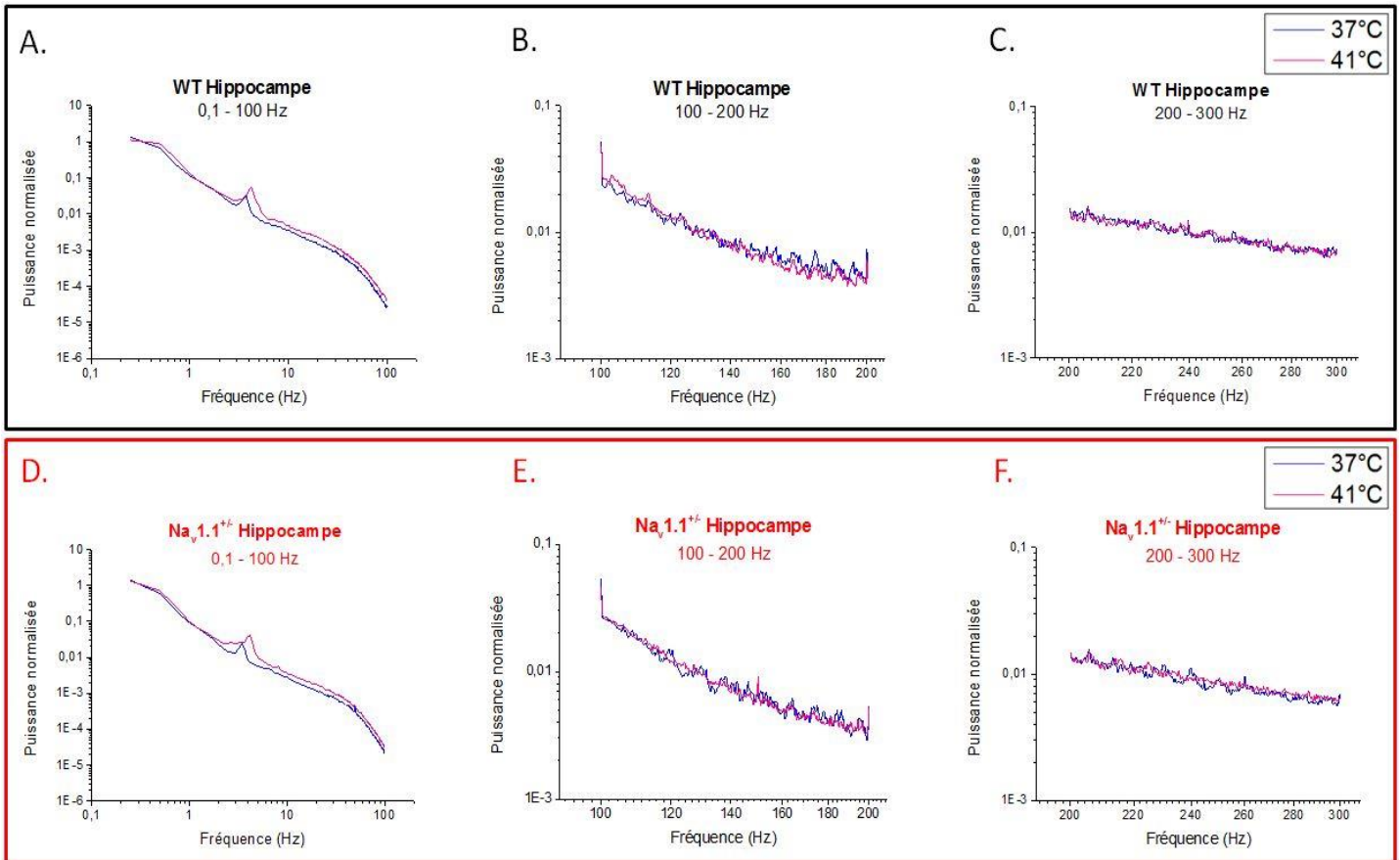


Fig. 51 : Puissances spectrales analysées à 37°C et à 41°C dans les hippocampes des souris WT et $Nav1.1^{+/-}$ représentées à 3 intervalles de fréquences. Courbes bleues : température corporelle à 37°C ; courbes roses : température corporelle à 41°C / Haut : Représentation de la puissance spectrale des potentiels enregistrés dans les hippocampes des souris WT, représentés entre 0.1 et 100 Hz (A), entre 100 et 200 Hz (B) et entre 200 et 300 Hz (C) / Bas : Représentation de la puissance spectrale des potentiels enregistrés dans les hippocampes des souris $Na_v1.1^{+/-}$, représentés entre 0.1 et 100 Hz (D), entre 100 et 200 Hz (E) et entre 200 et 300 Hz (F). WT $N = 10$ souris, $Na_v1.1^{+/-}$ $N = 10$ souris.

D'après ces résultats, les activités spontanées enregistrées dans le cortex et l'hippocampe du modèle murin du SD ne présentent pas de propriétés épileptiformes, de plus dans nos conditions expérimentales nous ne constatons donc pas de différences entre les activités spontanées du cortex et de l'hippocampe des souris WT et porteuses de la mutation $Na_v1.1^{+/-}$ durant la période pré-épileptiques.

Ces résultats seront bientôt soumis sous forme d'article pour publication (Lavigne et al., 2016).

Partie II :
Etude de l'épilepsie
chronique sur le modèle
murin du SD

Partie II : Etude de l'épilepsie chronique sur le modèle murin du SD

Dans un second temps, je me suis intéressé à la période d'épilepsie chronique du modèle murin du SD, en recherchant le meilleur modèle d'étude *in vitro* sur tranches de cerveau pour étudier l'effet d'éventuels traitements. Nous utilisons des tranches d'hippocampe prélevées sur des souris porteuses de la mutation hétérozygote KO pour le gène *Scn1a* et sur des souris WT âgées de 30 à 36 jours.

L'hyperexcitabilité spontanée est rarement observable sur des tranches de cerveau enregistrées en potentiel de champ, aussi nous avons choisi de comparer différentes solutions favorisant l'hyperexcitabilité, afin de trouver le modèle d'induction d'activités épileptiformes *in vitro* (présentant des caractéristiques d'activités enregistrées sur l'EEG de patients épileptiques) optimal pour étudier spécifiquement le modèle murin du SD et pouvoir tester l'efficacité de traitements potentiels :

- Des études réalisées sur des tranches d'hippocampe ont montré que la perfusion avec une solution contenant une forte concentration de K^+ induisait des décharges épileptiformes (Korn et al., 1987; Leschinger et al., 1993; Traynelis and Dingledine, 1988). Cela est dû au fait qu'à l'état de repos, les neurones ont une concentration de potassium intracellulaire d'environ 140 mmol/L alors qu'elle n'est que de 5 mmol/L dans le milieu extracellulaire ; donc l'augmentation de K^+ extracellulaire va entraîner la dépolarisation du neurone et le déclenchement de PA qui conduit donc à l'induction d'hyperexcitabilité.
- L'absence de Mg^{2+} dans les solutions perfusant les tranches d'hippocampe provoque également l'apparition d'activités épileptiformes (Anderson et al., 1986; Leschinger et al., 1993; Lewis et al., 1990). Le Mg^{2+} au niveau cérébral a pour rôle physiologique de bloquer les récepteurs canaux NMDA, qui sont des récepteurs permettant l'entrée de Ca^{2+} dans les neurones et la sortie de K^+ lorsque du glutamate ou de la glycine se fixe dessus, favorisant donc l'excitabilité des neurones. Le Mg^{2+} libère le canal lorsqu'un seuil de dépolarisation est atteint. La perfusion des tranches avec une solution sans Mg^{2+} permet donc aux récepteurs NDMA d'être activables sans notion de seuil, entraînant une hyperexcitabilité des neurones et donc du réseau.
- La 4-Aminopyridine (4-AP) est un bloqueur des canaux K^+ favorisant l'augmentation de l'excitabilité des neurones excitateurs et inhibiteurs connu pour induire des décharges épileptiformes *in vitro* (Avoli, 1990; Avoli and de Curtis, 2011). Une étude réalisée récemment au laboratoire a montré que la perfusion des tranches Hippocampo-Corticales avec de la 4-AP induit l'apparition d'activités ressemblant à des activités « interictales » dans le SR CA1 de l'hippocampe, d'activités ressemblant à des activités « ictales » dans le CE des tranches des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$, mais également des activités spécifiques, appelées « activités multicomponents », uniquement dans le cortex des souris mutantes (Liautard et al., 2013).

J'ai donc comparé l'effet d'une solution de LCSa contenant une forte concentration de K^+ (LCSa high K^+), à une solution de LCSa sans Mg^{2+} (LCSa Mg^{2+} free) et à de la 4-AP en enregistrant l'activité du réseau Hippocampo-Cortical sur des tranches de cerveau grâce à des électrodes en potentiel de champ.

1. Perfusion des tranches Hippocampo-Corticales avec du « LCSa High-K⁺ »

J'ai évalué l'effet d'une solution de LCSa contenant une forte concentration de K⁺ sur le réseau Hippocampo-Cortical prélevé sur le modèle murin du SD et des souris WT âgées de 30 à 35 jours (voir matériel & méthodes).

Les tranches de cerveau ont été perfusées avec du LCSa contenant soit 9mM, soit 12mM de potassium (la concentration physiologique extracellulaire étant de 5mM) et l'effet a été enregistré dans différentes structures de l'hippocampe (SR CA3, SR CA1, SP CA1) et dans le CE à différents temps jusqu'à 1h30 de perfusion (WT : N=4, Na_v1.1^{+/-} : N=4 ; 1 tranche par souris).

Malheureusement, bien que je constate de l'hyperexcitabilité (bouffées de décharges) dans certaines tranches WT et Na_v1.1^{+/-} à partir de 15 min de perfusion avec les 2 concentrations utilisées, celle-ci est très aléatoire au cours du temps et entre les différentes tranches. De plus, le traitement induit des dépressions envahissantes dans toutes les tranches, qui correspondent à des vagues de dépolarisation dues à une hyperexcitabilité qui se propage suivit d'une vague d'inhibition (Fig. 52).

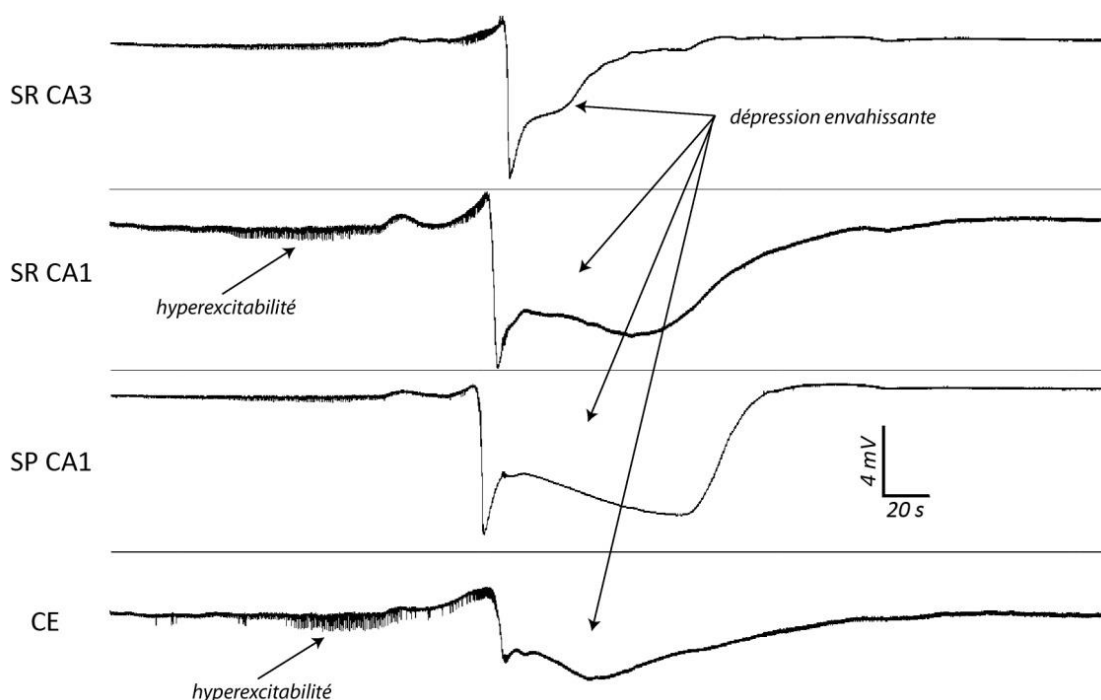


Fig. 52 : Exemple représentatif de l'enregistrement des activités spontanées dans le réseau Hippocampo-Cortical soumis à du « LCSa High-K⁺ ». Enregistrement en potentiel de champ du SR CA3, du SR CA1, du SP CA1 et du CE dans lesquels on peut voir la présence de bouffées de décharges suivies d'une dépression envahissante.

La grande variabilité des résultats et la succession des dépressions envahissantes rendent les résultats difficiles à analyser et suggère que la perfusion de LCSa contenant une forte concentration de K⁺ (9 ou 12 mM) n'est pas un modèle d'induction d'hyperexcitabilité convenable pour l'étude du réseau Hippocampo-Cortical sur le modèle murin du SD.

2. Perfusion des tranches Hippocampo-Corticales avec du « LCSa Mg²⁺ free »

Le modèle de perfusion des tranches avec du LCSa sans Mg²⁺ a ensuite été testé. Nous avons perfusé les tranches Hippocampo-Corticales prélevées sur les souris mutantes et contrôles entre 30 et 35 jours avec du LCSa dépourvu de Mg²⁺ (LCSa Mg²⁺ free) et observé l'effet induit dans le SR CA1 de l'hippocampe et le CE au cours du temps (de 5 min à 2h30 de traitement ; voir matériel & méthodes).

De manière intéressante, on constate l'apparition d'hyperexcitabilité dans les tranches WT et Na_v1.1^{+/-} perfusées avec le « LCSa Mg²⁺ free » (WT : N = 7 souris, 23 tranches ; Na_v1.1^{+/-} : N = 6 souris, 21 tranches). En effet, on voit apparaître des activités semblables aux « multicomponents » dès 20 min de traitement dans le CE, puis à partir de 30 min on constate les premières activités ressemblant aux activités « ictales » dans le SR CA1 et le CE, et des activités semblables aux « interictales » apparaissent plus tardivement de manière régulière ou par bouffées dans le SR CA1, après 1h de traitement (Fig. 53). Ces 3 types d'activités se retrouvent dans toutes les tranches, cependant ces activités ne semblent pas suivre de chronologie particulière et sont très variables au cours du temps, car tout au long du traitement elles peuvent apparaître, disparaître, être présentes toutes les 3 au même moment, ou une seule à la fois.

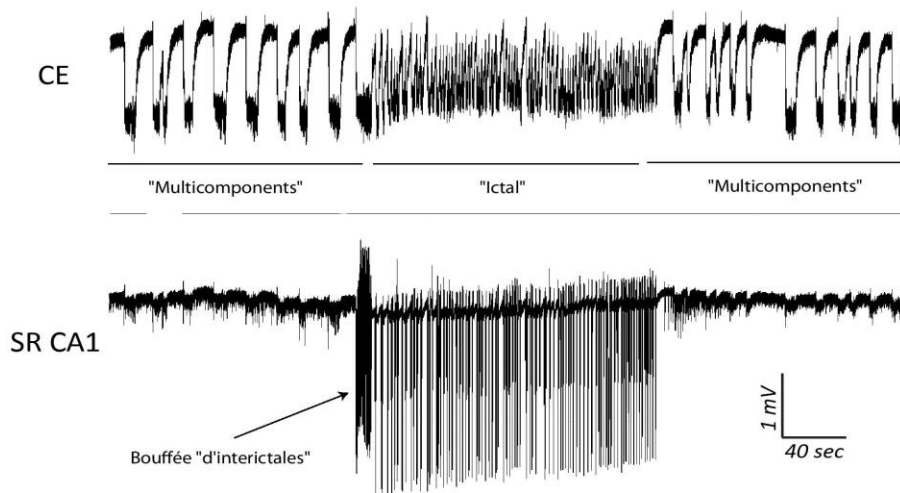


Fig. 53 : Exemple représentatif de l'enregistrement des activités spontanées dans le réseau Hippocampo-Cortical soumis à du « LCSa Mg²⁺ free ». Enregistrement en potentiel de champ du CE et du SR CA1 ; On peut voir des activités « multicomponents » dans le CE, ainsi qu'une activité « ictale » et une bouffée d'activités « interictales » dans le SR CA1 en même temps que l'activité « ictale » observée dans le CE.

La fréquence et la durée des activités de type « multicomponents » et « interictales » ne révèlent aucune différence entre les tranches WT et Na_v1.1^{+/-} (Fig. 54A, B, C et D). De manière similaire, la durée des activités de type « ictales » ne présentent pas non plus de différence entre les deux groupes (Fig. 54E). La fréquence des activités « interictales » n'a pas été analysée car ces activités sont trop peu fréquentes par rapports aux temps d'enregistrements (séquences de 10 min d'enregistrement).

Partie II : Etude de l'épilepsie chronique sur le modèle murin du SD

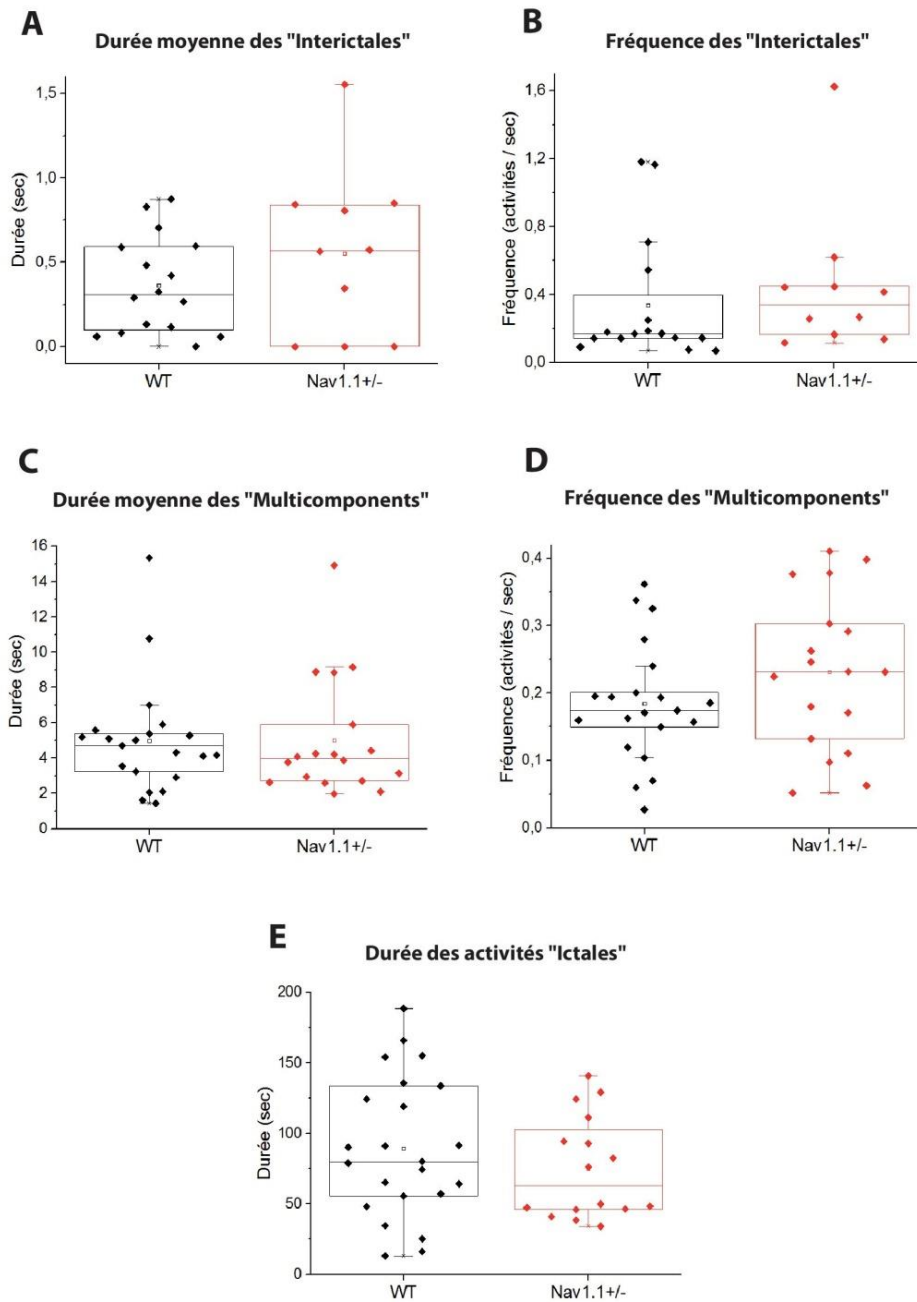


Fig. 54 : Analyse des activités induites par le « LCSa Mg²⁺ free ». A) et B) Box plots des durées moyennes et de la fréquence des « interictales » par tranche. C) et D) Box plots des durées moyennes et de la fréquence des « multicomponents » par tranche. E) Graphique des durées moyennes des activités « ictales » par tranches. (WT : N = 7 souris, 23 tranches ; Nav1.1^{+/-} : N = 6 souris, 21 tranches)

Ce modèle d'induction d'hyperexcitabilité ne permet pas de révéler de différence entre le modèle murin du SD et les tranches provenant des souris contrôles. Ce n'est donc pas un bon modèle pour étudier les modifications induites par la mutation KO du gène *Scn1a*.

3. Perfusion des tranches Hippocampo-Corticales avec de la 4-AP

Afin de poursuivre la caractérisation des activités induites par la perfusion de tranches Hippocampo-Corticales avec de la 4-AP initiée par « [Liautard et al., 2013](#) », j'ai prélevé des tranches de cerveau sur des souris $Na_v1.1^{+/-}$ et WT âgées de 30-35 jours (WT : N = 5 tranches, 3 souris ; $Na_v1.1^{+/-}$: N = 8 tranches, 3 souris), je les ai perfusé avec de la 4-AP et j'ai observé les activités dans le SR CA1 et dans le CE entre 30 min et 1h30 de traitement (voir matériel & méthodes).

Les analyses montrent que les activités « interictales » se retrouvent dans toutes les tranches des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$ et les activités « ictales » se retrouvent dans toutes les tranches WT et dans 6 tranches $Na_v1.1^{+/-}$ sur 8. Les activités « multicomponents » sont observables dans 4 tranches $Na_v1.1^{+/-}$ sur 6 (Durée moyenne = $1,89 \pm 0,06$ s ; Fréquence = $0,3 \pm 0,08$ activité/s), alors qu'il n'y en a pas dans les tranches WT (Fig. 55C). Je ne constate aucune différence entre les tranches provenant des souris mutantes et contrôles pour la fréquence ou la durée des activités de type « interictales » (Fréquence : WT = $0,6 \pm 0,2$ activité/s, $Na_v1.1^{+/-}$ = $0,8 \pm 0,2$ activité/s ; Durée : WT = $0,32 \pm 0,06$ s, $Na_v1.1^{+/-}$ = $0,28 \pm 0,04$ s) (Fig. 55A), ni pour la durée des activités de type « ictales » (Durée : WT = 40 ± 7 s, $Na_v1.1^{+/-}$ = 44 ± 8 s) (Fig. 55B). La fréquence des activités « ictales » est difficile à analyser, car elles ne sont pas très fréquentes par rapport au temps d'enregistrement (environ 10 min par enregistrement).

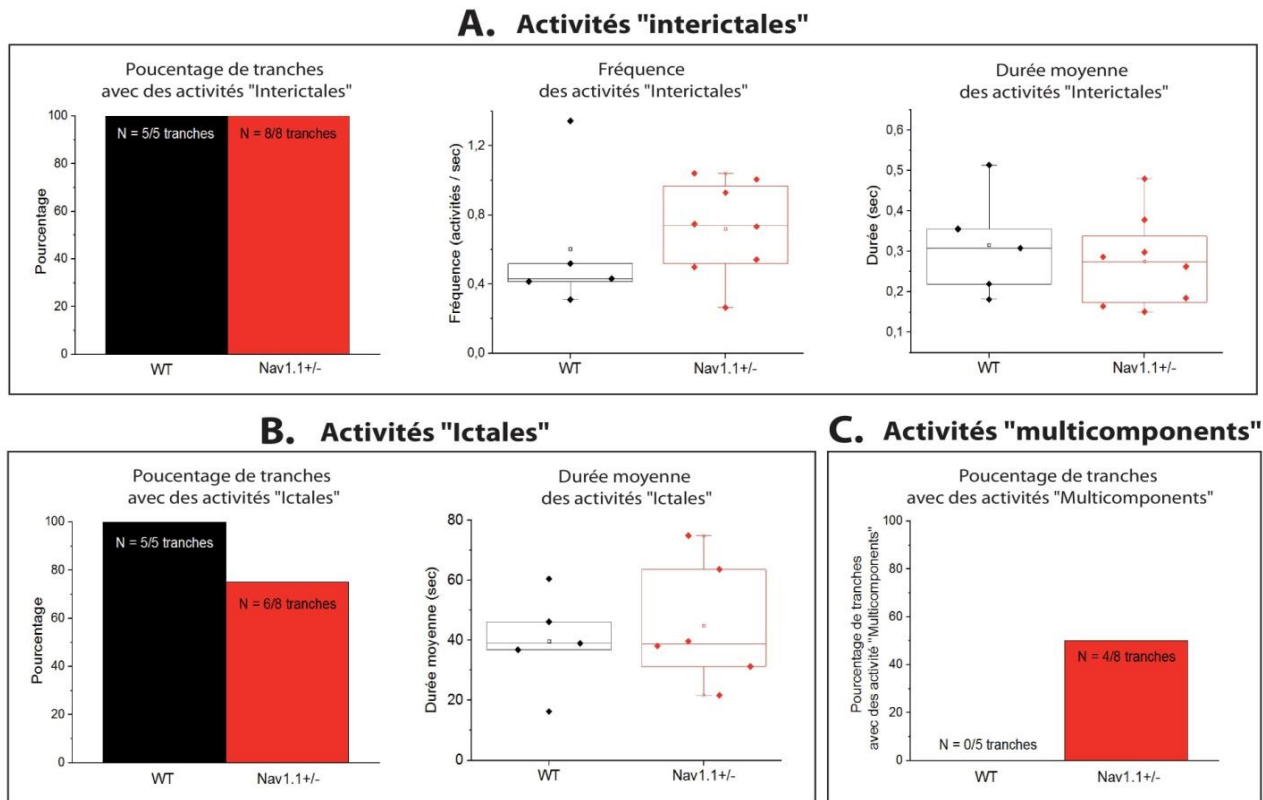


Fig. 55 : Analyse des activités induites par la 4-AP. A) Gauche : Graphique du pourcentage des tranches traitées exprimant des activités « interictales » ; milieu : Box plots de la fréquence des « interictales » par tranche ; droite : Box plots de la durée moyenne des activités « interictales » par tranche. B) Gauche : Graphique du pourcentage des tranches traitées exprimant des activités « ictales » ; droite : Box plots de la durée moyenne des activités « ictales » par tranche. C) Graphique du pourcentage des tranches traitées exprimant des activités « multicomponents ».

(WT N = 3 souris, 5 tranches ; $Na_v1.1^{+/-}$ N = 3 souris, 8 tranches)

Partie II : Etude de l'épilepsie chronique sur le modèle murin du SD

Pour les tranches WT et $Na_v1.1^{+/-}$, les activités « interictales » sont présentes dans le SR CA1 (et parfois détectables dans le CE) dès 30 min jusqu'à 1h30 de traitement avec la 4-AP. Les activités « ictales » dans le CE des tranches WT sont également détectables tout au long de l'observation (30 min à 1h30). En revanche, les activités « ictales » dans le CE des tranches $Na_v1.1^{+/-}$ sont détectables dès 30min mais ne sont plus présentes au-delà de 1h, alors que les activités « multicomponents » ne commencent à être détectées dans le CE des tranches des souris mutantes qu'à partir de 50 min de traitement (Fig. 56). D'après mes observations, il semblerait qu'en fonction du temps de traitement avec la 4-AP, les activités « ictales » laissent progressivement place aux activités « multicomponents » dans les tranches des souris mutantes.

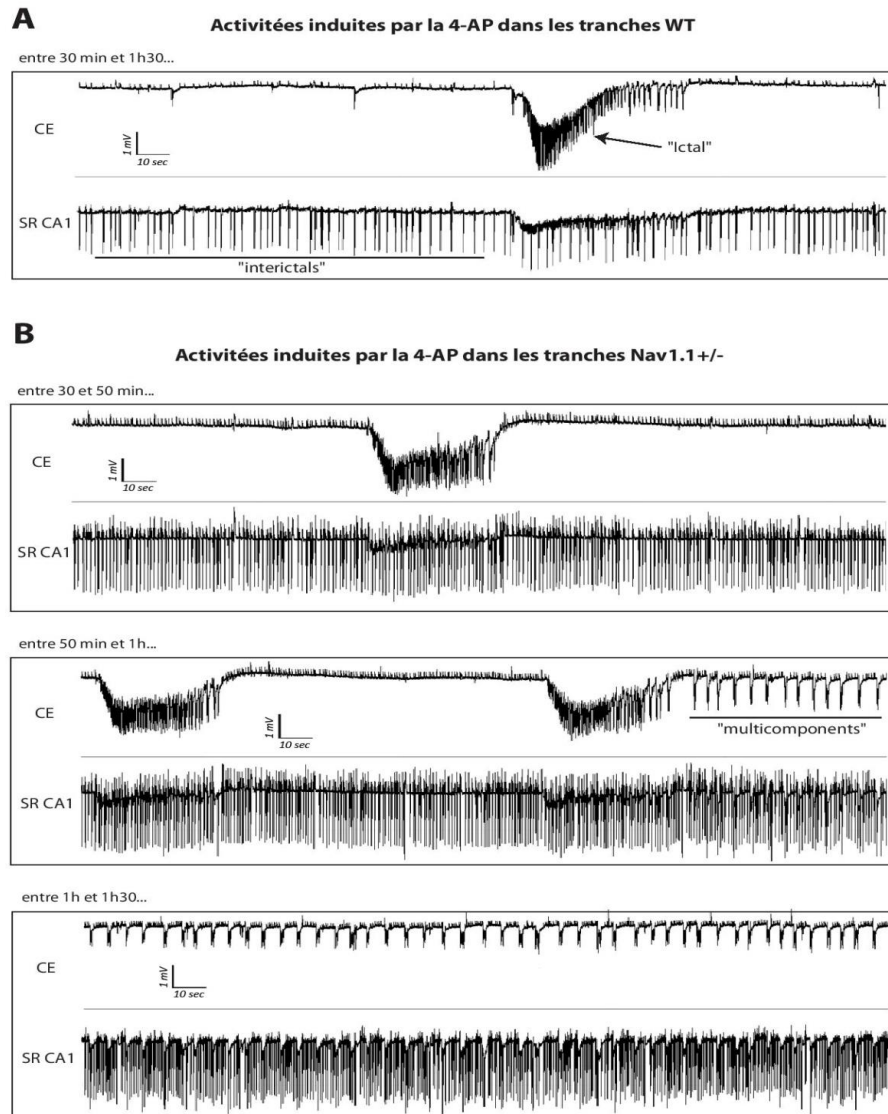


Fig. 56 : Exemples représentatifs des activités induites par la 4-AP. A) Exemple des activités observées dans une tranche WT entre 30 min et 1h30 de traitement : on voit une activité « ictale » dans le CE et des activités « interictales » dans le SR CA1. B) Haut : exemple des activités observées dans une tranche $Na_v1.1^{+/-}$ entre 30 et 50 min de traitement : on voit une activité « ictale » dans le CE et des activités « interictales » dans le SR CA1 ; Milieu : exemple des activités observées dans une tranche $Na_v1.1^{+/-}$ entre 50 min et 1h de traitement : on voit une activité « ictale » et l'apparition de « multicomponents » dans le CE et des activités « interictales » dans le SR CA1 ; Bas : exemple des activités observées dans une tranche $Na_v1.1^{+/-}$ entre 1h et 1h30 de traitement : on voit des « multicomponents » dans le CE et des activités « interictales » dans le SR CA1.

Partie II : Etude de l'épilepsie chronique sur le modèle murin du SD

Au vu de ces résultats, la 4-AP semble être un meilleur modèle d'induction d'hyperexcitabilité sur tranches que le « High-K⁺ » ou le « Mg²⁺ free » pour étudier l'excitabilité du réseau Hippocampo-Cortical dans le modèle du SD et donc pour visualiser l'effet de différents traitements.

4. Effet de la CBZ sur le modèle d'induction d'hyperexcitabilité « 4-AP »

Afin de vérifier la validité de ces conditions expérimentales pour l'étude de l'effet de traitements sur le modèle du SD, après 1h30 de traitement avec la 4-AP nous avons décidé de perfuser les tranches avec de la 4-AP + carbamazépine (CBZ) durant 1h (voir matériel & méthodes ; WT : N = 3 souris, 5 tranches ; Na_v1.1^{+/-} : N = 3 souris, 6 tranches). Cet antiépileptique a un effet aggravant sur les crises des patients atteints du SD. Nous supposons donc que l'application de CBZ peut entraîner une augmentation de l'hyperexcitabilité induite par la 4-AP dans les tranches porteuses de la mutation Na_v1.1^{+/-}.

D'après les analyses, la CBZ n'a pas d'effet sur les activités de type « interictales » induites par la 4-AP dans les tranches WT (Fig. 57A), ce qui est en accord avec l'article de « D'Antuono et al., 2010 » qui avait déjà montré que la CBZ n'avait pas d'effet sur ces activités induites par la 4-AP dans des tranches d'hippocampe de rats. En revanche elle modifie les caractéristiques des activités « interictales » des tranches Na_v1.1^{+/-} en augmentant leur fréquence (4-AP = 0,7±0,1 activités/s ; 4-AP + CBZ = 1,5±0,3 activités/s ; *test U de MannWhitney* p* = 0,02) et en diminuant leur durée (4-AP = 0,28±0,04 s ; 4-AP + CBZ = 0,15±0,02 s ; *test U de MannWhitney* p* = 0,04) (Fig. 57D).

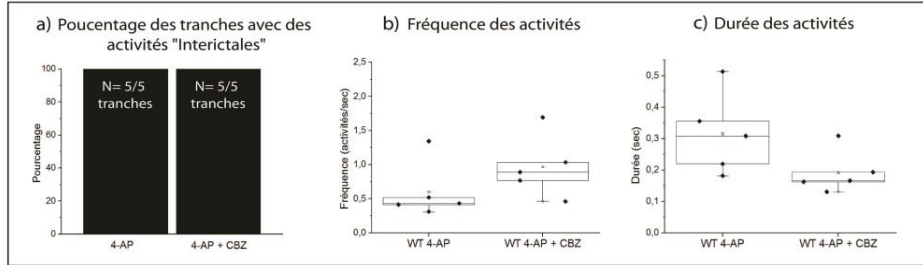
La CBZ réduit les activités « ictales » dans les tranches des souris WT et Na_v1.1^{+/-}. En effet, le traitement avec la 4-AP avait engendré l'apparition de ce type d'activité dans toutes les tranches WT (N=5) et après traitement avec la 4-AP + CBZ on ne retrouve plus que des activités « ictales » dans 2 tranches WT sur 5 (réduction non significative p = 0,06) et leur durée moyenne est moins longue qu'avant le traitement à la CBZ (4-AP = 40±7 s ; 4-AP + CBZ = 22±0,6 s ; *test U de MannWhitney* p* = 0,03). Pour les tranches Na_v1.1^{+/-}, la 4-AP avait induit l'apparition d'activités « ictales » dans 6 tranches sur 8 et le traitement à la CBZ les a totalement fait disparaître (*test U de MannWhitney* p** = 0,008) (Fig. 57B et E).

De manière surprenante, suite à l'administration de 4-AP + CBZ on note une apparition d'activités de type « multicomponents » dans 3 tranches WT sur 5, alors qu'il n'y en avait pas initialement avec la 4-AP seule, bien que ces résultats ne donnent pas de différence significative (*test U de MannWhitney* p = 0,06) (Fig. 57C). Dans les tranches des souris mutantes, il n'y a pas de changement des activités de type « multicomponent » (Fig. 57F).

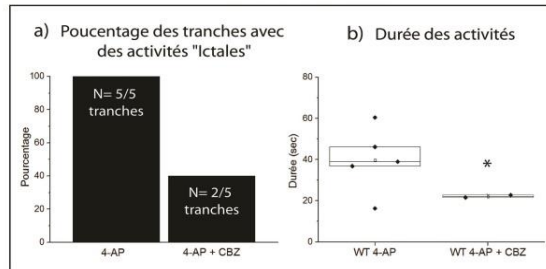
Partie II : Etude de l'épilepsie chronique sur le modèle murin du SD

Tranches des souris WT

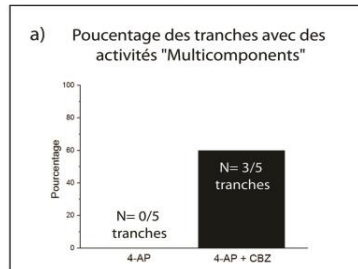
A. Activités "Interictales" des tranches WT



B. Activités "Ictales" des tranches WT

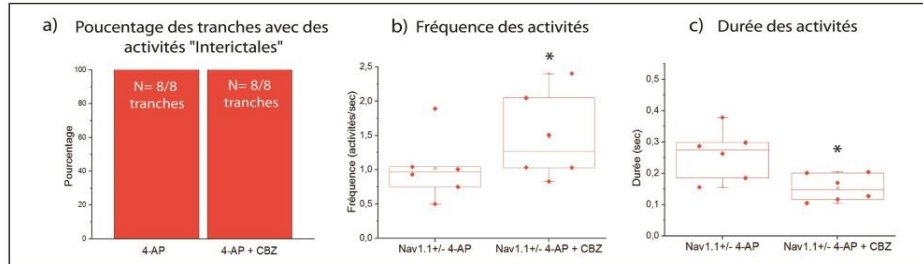


C. Activités "Multicomponents" des tranches WT

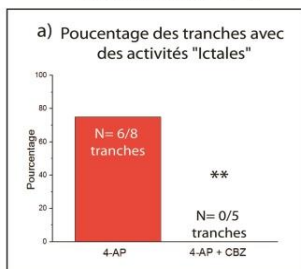


Tranches des souris Nav1.1 +/-

D. Activités "Interictales" des tranches Nav1.1 +/-



E. Activités "Ictales" des tranches Nav1.1 +/-



F. Activités "Multicomponents" des tranches Nav1.1 +/-

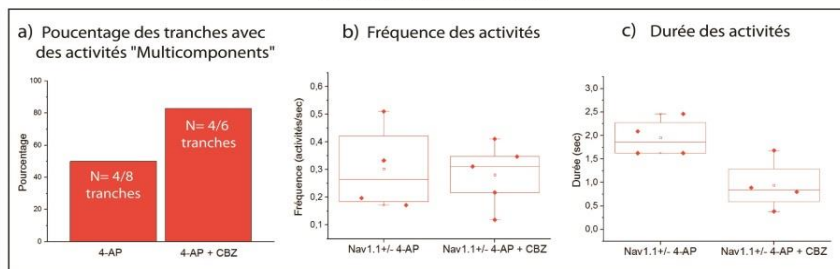


Fig. 57 : Analyse des activités induites par la 4-AP + CBZ. A), B) et C) Analyse des activités dans les tranches WT avant et après ajout de la CBZ. D), E) et F) Analyse des activités dans les tranches Nav1.1^{+/-} avant et après ajout de la CBZ. A) et D) Gauche : Graphique du pourcentage des tranches traitées exprimant des activités « interictales », milieu : Box plots de la fréquence des « interictales » par tranche, droite : Box plots de la durée moyenne des activités « interictales » par tranche. B) et E) Graphique du pourcentage des tranches traitées exprimant des activités « ictales » et Box plots de la durée moyenne des activités « ictales » pour les tranches WT. C) et F) Graphique du pourcentage des tranches traitées exprimant des activités « multicomponents », et pour les tranches Nav1.1^{+/-} : Box plots de la fréquence et de la durée moyenne des activités « multicomponents » par tranche.

Partie II : Etude de l'épilepsie chronique sur le modèle murin du SD

Alors que l'on s'attendait à une aggravation de l'hyperexcitabilité dans les tranches provenant des souris mutantes, comme c'est le cas chez les patients atteints du SD, la CBZ semble ne pas avoir d'effet aggravant sur l'hyperexcitabilité induite par la 4-AP dans ces tranches. En effet, suite à l'hyperexcitabilité induite dans les tranches des souris mutantes, la CBZ provoque un changement de rythme des activités « interictales » et une abolition des activités « ictales », en revanche elle n'a pas d'effet sur les activités de type « multicomponent » qui sont spécifiques des tranches porteuses de la mutation. De plus, bien que la CBZ réduise également les activités « ictales » dans les tranches WT, elle provoque l'apparition d'activités « multicomponents », induisant donc une nouvelle forme d'hyperexcitabilité dans les tranches contrôles initialement soumises à la 4-AP.

Ces résultats révèlent donc qu'il est difficile d'utiliser les conditions expérimentales d'induction d'hyperexcitabilité *ex vivo* sur ce modèle murin pour reproduire l'hyperexcitabilité cérébrale observée chez les patients atteints du SD et pour étudier l'effet de différents traitements.

Pour la dernière partie de ma thèse, portant sur le développement d'une nouvelle stratégie visant à réduire l'hyperexcitabilité cérébrale, nous avons préféré utiliser un modèle d'étude plus intégré en observant directement l'effet de ce « traitement » sur les crises *in vivo* dans un premier temps. L'utilisation des tranches de cerveau pourra cependant fournir des informations complémentaires de l'impact de cette stratégie sur les mécanismes du réseau dans des expériences futures.

Partie III :

**Nouvelle stratégie pour réduire
l'hyperexcitabilité cérébrale
dans le modèle murin du SD**

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

Le SD étant une épilepsie génétique pharmaco-résistante avec un phénotype sévère, nous avons choisi son modèle murin pour tester une nouvelle stratégie visant à réduire l'hyperexcitabilité cérébrale responsable de la génération des crises épileptiques. Cette épilepsie est due à une mutation perte de fonction du canal $Na_v1.1$ affectant spécifiquement les neurones inhibiteurs. Nous avons donc pour but de contrôler l'excitabilité du réseau cérébral en réduisant spécifiquement l'activité des neurones excitateurs afin de restaurer l'équilibre dans la balance excitation/inhibition de l'activité cérébrale. Pour ce faire nous avons choisi d'utiliser une technique d'interférence à ARN (ARNi) pour réduire l'expression des canaux sodiques voltages dépendants (Na_v). Cet ARNi est introduit dans un vecteur AAV contenant un promoteur CamKIIa, permettant son expression spécifiquement dans les neurones Glutamatergiques.

Le développement de cette nouvelle stratégie thérapeutique s'est décomposé en 3 parties :

- 1) Développement et la validation *in vitro* de la construction contenant l'ARNi contre les canaux sodiques.
- 2) Introduction de cette construction dans un vecteur AAV et validation de son expression *in vitro* et *in vivo*.
- 3) Evaluation de l'effet de cette stratégie sur les crises observées *in vivo* sur le modèle murin du SD.

1. Validation de l'ARNi permettant de réduire les courants sodiques dans les neurones glutamatergiques

Les ARNi choisis sont des hybrides mi/shARN permettant de cibler la majorité des canaux sodiques dépendants du voltage (Na_v) présents dans le cerveau ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ et $Na_v1.6$) exprimés avec une protéine fluorescente GFP pour visualiser leur expression. Afin de tester leur efficacité, nos collaborateurs ont initialement déterminé le niveau d'expression des différents isoformes des canaux Na_v dans des cultures primaires de neurones à différents jours *in vitro* (jiv), afin de trouver la période optimale pour mesurer la réduction de l'expression des canaux Na_v . Ainsi, des expériences de quantification d'ADN (réaction en chaîne par polymérase quantitative ou qPCR) et de détection protéique (*western blot*) à l'aide d'un anticorps capable de cibler tous les isoformes des canaux Na_v (Pan Na_v) ont révélé une expression significative des canaux Na_v entre 7 et 14 jiv (Fig. 58).

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

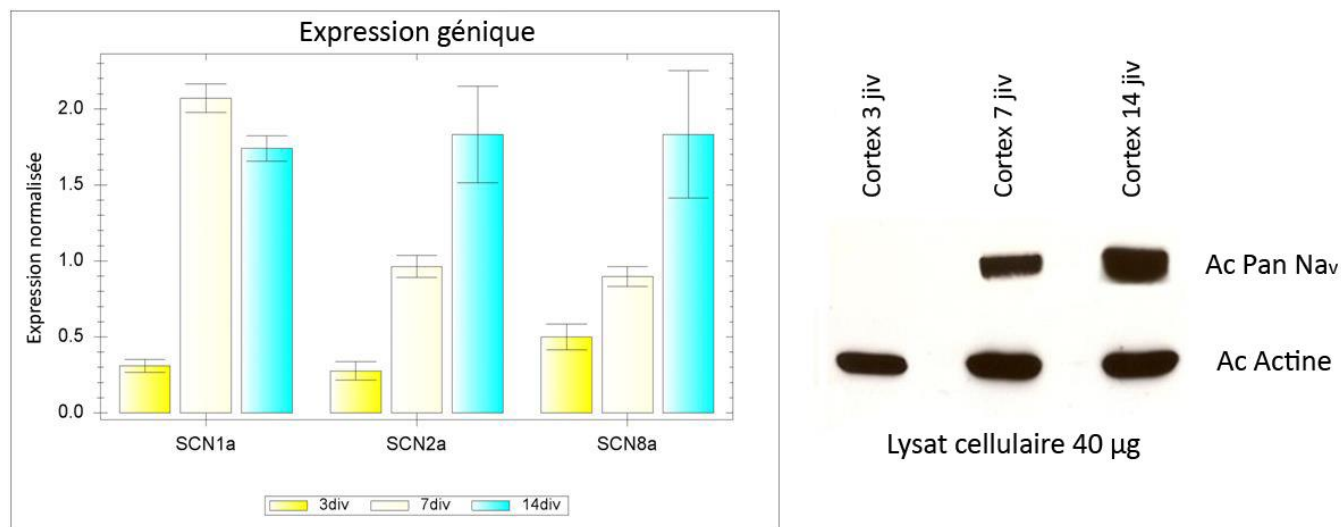


Fig. 58 : Profil d'expression des différents canaux Na_v dans des cultures primaires de neurones corticaux. Réaction en chaîne par polymérase quantitative (« quantitative Polymerase Chained reaction » ou qPCR) et Westernblot réalisés sur des cultures primaires de neurones corticaux à différents jours in vitro (jiv) révélant une augmentation de l'expression des canaux Na_v au cours de la maturation neuronale. Gauche : qPCR montrant le niveau d'expression des isoformes des canaux Na_v normalisé par rapport à l'actine, la GAPDH et la β -III Tubuline en utilisant la méthode $\Delta\Delta Ct$. Droite : Westernblot d'un lysat de protéines cellulaire provenant des cultures de neurones corticaux réalisés aux mêmes jiv que la qPCR en utilisant un anticorps contre tous les canaux Na_v (Pan Na_v) et un anticorps contre l'actine comme contrôle.

Par ailleurs, des expériences d'immunocytochimie réalisées avec l'anticorps Pan Na_v montrent un signal particulièrement intense au niveau du SIA à 11 jiv, reflétant une forte expression des canaux Na_v à ce niveau et suggérant que la meilleure période pour tester l'efficacité des mi/shARN contre les canaux Na_v corresponde à 11 jiv. Les neurones corticaux ont été transfectés le jour de leur mise en culture (0 jiv) avec les constructions mi/shARN-GFP contre les canaux Na_v (mi/shARN-GFP anti Na_v) et avec les constructions de mi/shARN-GFP possédant une séquence « brouillée » (utilisée comme contrôle). Ces constructions sont synthétisées avec un promoteur de cytomégalo virus (CMV) permettant une bonne expression dans les cellules eucaryotes. L'expression des Na_v a été étudiée à 11 jiv.

Les expériences d'immunocytochimie révèlent une diminution de 38% de la fluorescence relative au marquage des canaux Na_v (Pan Na_v) dans les neurones transfectés avec les plasmides contenant la construction mi/shARN-GFP anti Na_v comparé aux neurones transfectés avec les plasmides contenant la construction contrôle (Fig. 59).

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

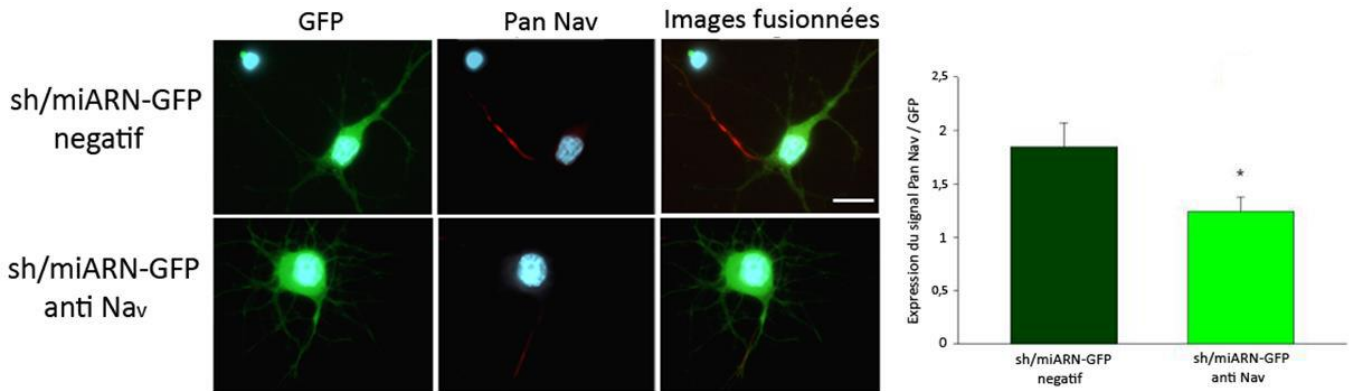


Fig. 59 : Réduction de la détection de tous les isoformes de canaux Na_v au niveau du segment initial de l'axone (SIA) en utilisant les mi/shARN. Gauche : Cultures primaires de neurones transfectées avec les mi/shARN (contrôles et contre les canaux Na_v) jusqu'à 11 jiv. Elles ont ensuite été marquées avec un anticorps monoclonal ciblant tous les isoformes des canaux Na_v (Pan Na_v , en rouge). On peut voir que les cellules GFP+ (vertes) transfectées avec les mi/shARN anti Na_v ont une réduction significative du signal Na_v , qui n'est pas observé dans les cellules GFP+ transfectées avec les mi/shARN contrôles. Droite : Graphique montrant le ratio entre les signaux Na_v et GFP pour les neurones transfectés avec les mi/shARN contrôles (vert foncé) et avec les mi/shARN anti- Na_v (vert clair).

De plus, l'efficacité des plasmides ciblant l'expression des canaux Na_v a également été testée via des expériences de patch-clamp, révélant une réduction significative de la densité de courant Na^+ dans les neurones transfectés avec la construction mi/shARN-GFP anti Na_v comparée à la construction contrôle. Et aucune différence n'a été constatée entre les propriétés de décharge des neurones transfectés avec les plasmides contrôles comparé aux neurones non transfectés (*résultats non montrés*).

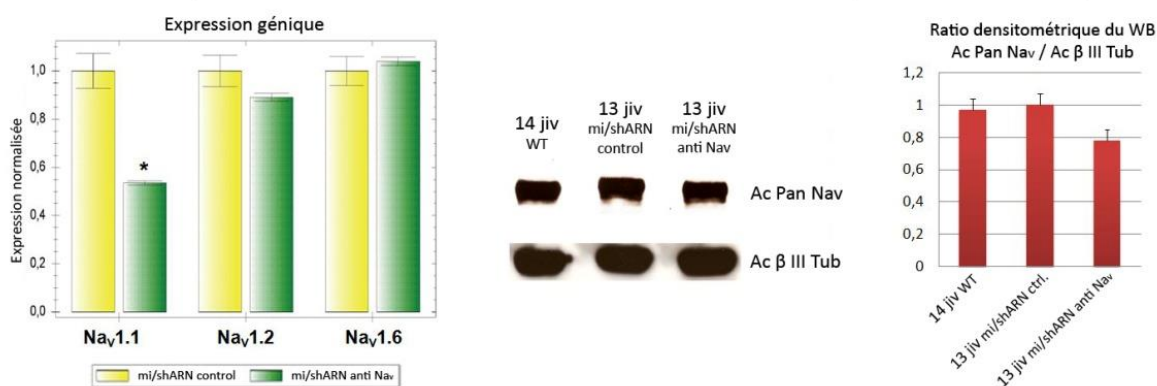
Ces expériences permettent donc de valider l'efficacité des mi/shARN réduisant l'expression des canaux Na_v et de vérifier l'innocuité de la construction contrôle sur les propriétés de décharge des neurones.

2. Validation du vecteur viral contenant la séquence d'intérêt

Initialement, nous avons introduit les constructions mi/shARN-GFP contrôles et ciblées contre les canaux Na_v dans un plasmide lentiviral pLL3.7 avec le promoteur « U6 », un promoteur aspécifique de mammifère permettant l'expression des séquences d'intérêt dans tous les types cellulaires. Les cultures de neurones corticaux primaires ont été infectées avec ces vecteurs lentiviraux et l'effet a été observé entre 7 et 10 jours post-infection (jpi).

➤ Les analyses de quantification d'ADN (réaction en chaîne par polymérase quantitative ou qPCR) et de détection protéique (*western blot*) montrent une diminution du niveau des canaux Na_v dans les neurones transfectés avec le vecteur lentiviral contenant la construction active comparé à ceux transfectés avec la construction contrôle. Cette réduction est plus marquée dans les neurones observés à 18 jiv (transfectés à 10 jiv) qu'à 13 jiv (neurones transfectés à 4 jiv) (Fig. 60).

A. Niveau d'expression des canaux Nav dans des neurones infectés à 4 jiv et observés à 13 jiv.



B. Niveau d'expression des canaux Nav dans des neurones infectés à 10 jiv et observés à 18 jiv.

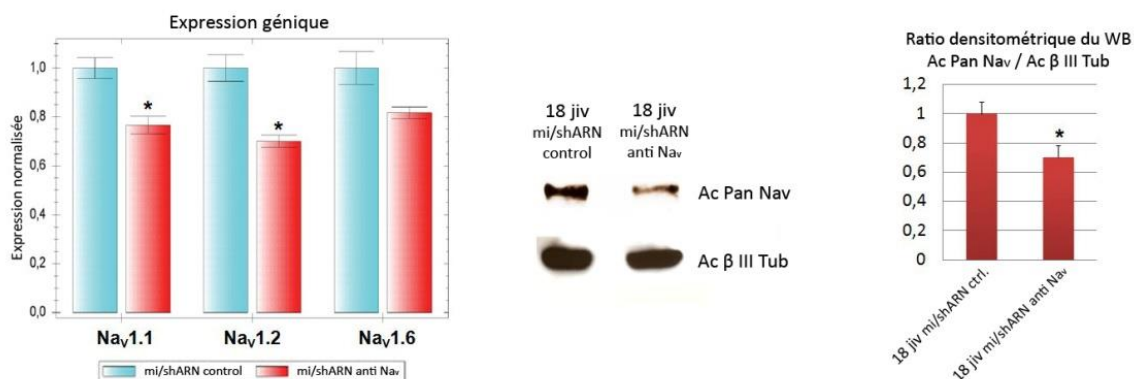


Fig. 60 : Vecteur Lentiviral induisant la réduction de l'expression des canaux Na_v dans des cultures primaires de neurones corticaux. A) Niveau d'expression des canaux Na_v dans des neurones infectés à 4 jiv et observés à 13 jiv. B) Niveau d'expression des canaux Na_v dans des neurones infectés à 10 jiv et observés à 18 jiv. Gauche : qPCR montrant le niveau d'expression des isoformes des canaux Na_v normalisé par rapport à l'actine, la GAPDH et la β -III Tubuline en utilisant la méthode $\Delta\Delta Ct$. Milieu : Westernblot d'un lysat de protéines cellulaire provenant des cultures de neurones corticaux réalisés avec un anticorps contre tous les canaux Na_v (Pan Na_v) et la β -III Tubuline comme contrôle. Droite : Ratio densitométrique du Westernblot.

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

➤ Des analyses immunocytochimiques ont été réalisées sur les neurones fluorescents (infectés avec les constructions GFP+) à l'aide d'un anticorps qui cible spécifiquement une protéine des axones (Ankyrine G) et d'un anticorps ciblant les canaux sodiques dépendants du voltage (Pan Nav_v), révélant une diminution du marquage des canaux Na_v au niveau des axones des cellules infectées avec le plasmide lentiviral contenant la construction mi/shARN anti Nav_v comparé à la construction contrôle (Fig. 61).

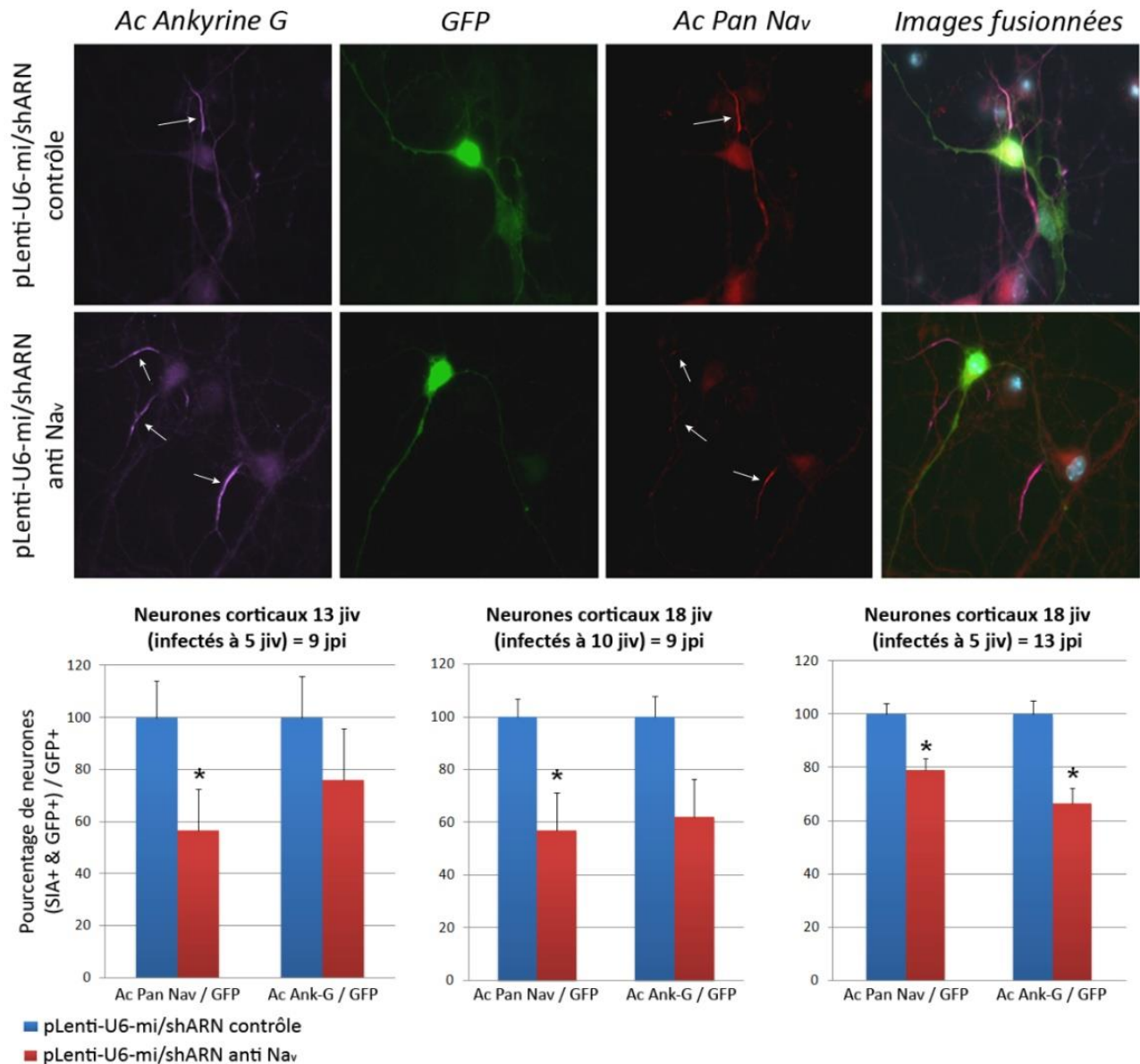


Fig. 61 : Immunomarquage des cellules infectées avec le vecteur lentiviral induisant la réduction de l'expression des canaux Na_v dans des cultures primaires de neurones corticaux. Haut : Images représentatives des neurones corticaux primaires infectés avec les vecteurs lentiviraux (GFP+, vert) à 9 jpi, immunomarqués avec des anticorps ciblant l'Ankyrine G (violet) et ciblant les canaux Na_v (PanNav_v) (rouge). Bas : évaluation quantitative de la fluorescence reflétant l'expression des Na_v et de l'Ankyrine G au niveau du SIA dans les cellules GFP+, réalisée à différents jiv. Les données sont représentées en moyenne ± erreur standard de 25 neurones par condition pour 3 préparations différentes. Test statistique : t-test.

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

➤ Enfin, des enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp ont également été réalisés sur les cellules infectées avec les constructions lentivirales. Les analyses mettent en évidence une réduction de la densité de courant (Fig. 62A) et de la fréquence de décharge dans les neurones infectés avec la construction exprimant des ARNi contre les canaux Na_v (Fig. 62 B et C), ainsi qu'une réduction de la pente maximale des PA (correspondant à la phase de dépolarisation) et une augmentation de la latence pour chaque PA par rapport aux neurones infectés avec la construction contrôle et aux neurones non infectés (Fig. 62D). Aucune différence n'est constatée entre les neurones non infectés et ceux infectés avec le vecteur viral contenant la construction contrôle.

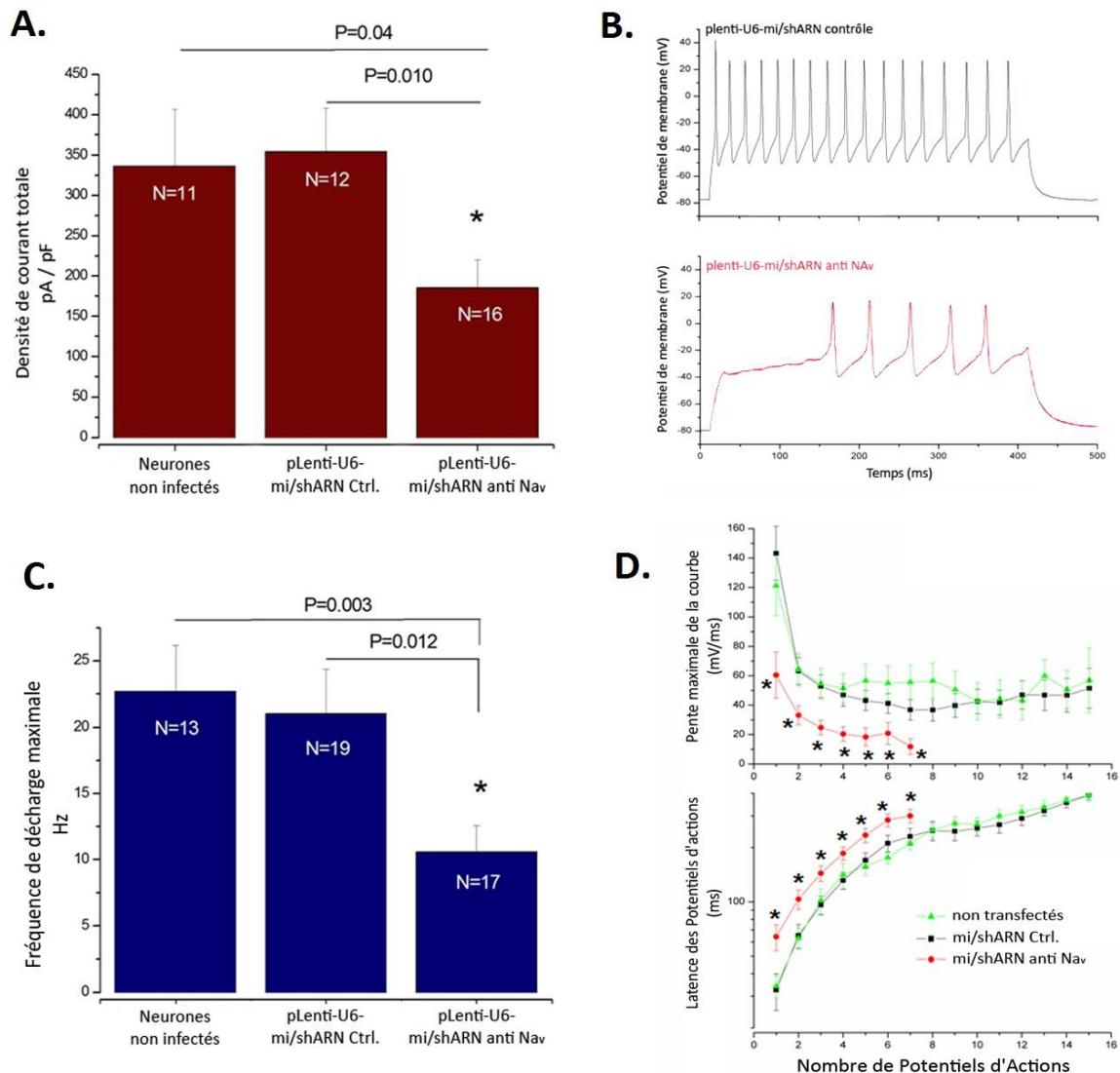


Fig. 62 : Analyse fonctionnelle du vecteur lentiviral induisant la réduction de l'expression des canaux Na_v dans des cultures primaires de neurones corticaux. Expériences de patch-clamp sur des neurones corticaux en culture non infectés, infectés à 5 jiv et enregistrés à 12 jiv avec les vecteurs lentiviraux contenant le mi/shARN contrôles ou anti- Na_v . A) Graphique de la densité de courant maximum moyenne. B) Exemple représentatif de traces de décharge de PA maximum en réponse à des injections de courant dépolarisant d'un neurone infecté avec le vecteur lentiviral contrôle (noir) et contenant les mi/shARN anti- Na_v (rouge). C) Graphique de la fréquence des PA. D) Courbes de la pente maximale moyenne des PA et courbes de la latence de chaque PA par rapport à l'injection de courant.

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

➤ Ces résultats permettent donc de valider l'efficacité de la construction mi/shARN anti-Na, introduite dans un vecteur viral. Cependant, le vecteur lentiviral possède une faible capacité de dispersion et n'infecte pas un volume cérébral suffisamment large. Nous avons donc décidé de nous tourner vers un vecteur AAV, ayant une meilleure capacité de diffusion. Puisque nous souhaitons cibler spécifiquement les neurones excitateurs, nous avons choisi d'utiliser un promoteur de la protéine kinase Ca^{2+} -calmoduline dépendante (CamKIIa), qui est spécifiquement exprimée dans les neurones excitateurs, pour cibler les neurones excitateurs avec nos constructions virales car des études ont montré sa spécificité pour les neurones Glutamatergiques *in vivo* (Zhang et al., 2010).

Nos collaborateurs ont initialement infecté des neurones corticaux en culture avec un plasmide lentiviral (PL4) possédant le promoteur CamKIIa et une protéine fluorescente mCherry, permettant de marquer les neurones infectés et un marquage a également été effectué avec un anticorps anti-GABA, spécifique des neurones inhibiteurs (Fig. 63A). Différents volumes de plasmides ont été administrés (0.5 μ l, 1 μ l et 2 μ l) dans les puits contenant 60.000 neurones, permettant d'infecter 40 à 60% des neurones (Fig. 63B). Cependant 40% des neurones infectés correspondent à des neurones GABAergiques (Fig. 63C), suggérant que nous n'obtenons pas la spécificité souhaitée pour les neurones Glutamatergiques *in vitro*.

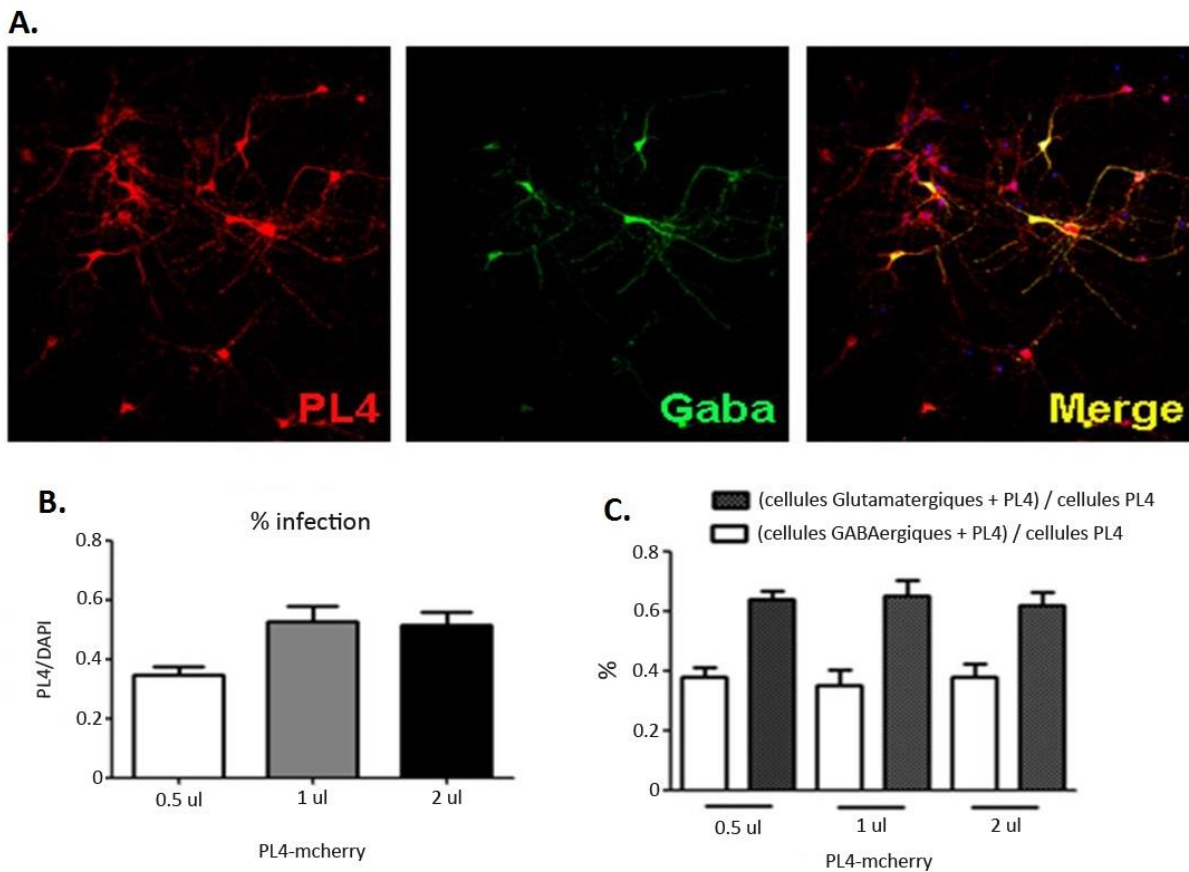


Fig. 63 : Plasmide lentiviral possédant un promoteur CamKIIa et une protéine fluorescente mCherry (PL4-mCherry).
A) Images représentatives de neurones corticaux primaires transduits avec le plasmide lentiviral possédant le promoteur CamKIIa (PL4, rouge), marqués avec l'anticorps anti-GABA (Gaba, vert) et leurs images mélangées (Merge).
B) Quantification de l'efficacité d'infection du plasmide en fonction du volume administré. C) Sélectivité du plasmide pour les neurones Glutamatergiques ou GABAergiques.

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

Nous avons également transfecté les cultures de neurones corticaux à 3 jiv avec un plasmide AAV contenant le promoteur CamKIIa (pAAV-CamKIIa-GFP) et nous avons pu voir une bonne fluorescence des neurones à 14 jiv (Fig. 64). L'observation de la morphologie des neurones révèle que 65% de ceux qui sont fluorescents ont une forme triangulaire, spécifique des neurones pyramidaux (neurones excitateurs), alors que 35% des cellules marquées par la GFP ont une forme bipolaire, représentative des neurones GABAergiques (inhibiteurs). Malgré le fait que la spécificité ne soit pas complète *in vitro*, des études ont mis en évidence une bonne sélectivité du promoteur CamKIIa pour les neurones excitateurs *in vivo* (Zhang et al., 2010), nous avons donc choisi de produire les vecteurs viraux AAV contenant le promoteur CamKIIa avec la construction mi/shARN-GFP contrôle (pAAV-CamKIIa-eGFP-Neg) ou la construction mi/shARN-GFP anti Na_v (pAAV-CamKIIa-eGFP-anti Na_v).

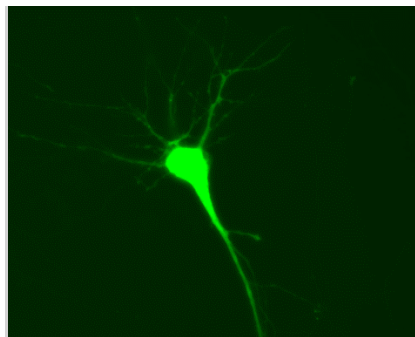


Fig. 64 : Image représentative d'un neurone cortical pyramidal (excitateur) transfecté à 3 jiv avec le pAAV-CamKIIa-eGFP et dont la fluorescence est observée à 14 jiv.

3. Evaluation de la stratégie *in vivo* sur le modèle murin du SD

- **Test des vecteurs viraux à des titres de particules infectieuses et volumes élevés**

Les vecteurs viraux ont été produits à un titre (ou concentration) élevé : 2.10^8 particules infectieuses (pi)/ml pour le vecteur AAV-CamKIIa-eGFP-Neg et 2.10^9 pi/ml pour le vecteur AAV-CamKIIa-eGFP-anti Na_v . Nous avons initialement testé ces fortes concentrations lors de premières injections *in vivo* avec un volume élevé (8 injections de $1 \mu\text{l}$; voir matériel & méthodes). Les images prises au microscope confocal révèlent une fluorescence très intense dans les hippocampes mais également dans le cortex, rendant difficile la distinction des cellules marquées (Fig. 65).

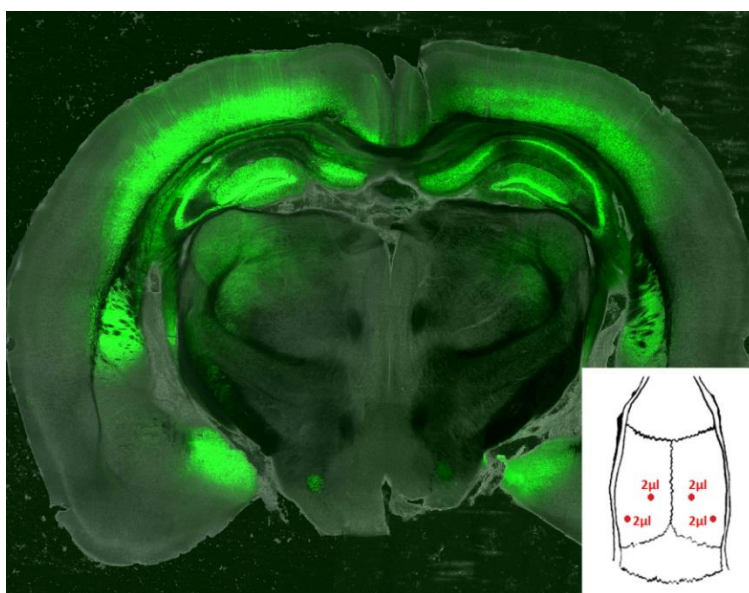


Fig. 65 : Image représentative de l'infection *in vivo* avec un titre infectieux et un volume élevés de vecteur AAV (AAV-CamKIIa-eGFP-anti Na_v : 2.10^9 pi/ml) révélant les cellules GFP+ fluorescentes (vertes).

Les constructions virales ont été injectées au niveau des hippocampes des souris porteuses de la mutation afin de tester l'effet de ces titres et volumes élevés d'injections virales sur les crises cloniques induites par hyperthermie et sur les crises spontanées enregistrées par vidéo-ECoG (Fig. 66) 5 jours après l'induction de crises sur 4 souris injectées avec le vecteur AAV-CamKIIa-eGFP-Neg (8 x $1 \mu\text{l}$ virus ; 2.10^8 pi/ml) et sur 7 souris injectées avec le vecteur AAV-CamKIIa-eGFP-anti Na_v (8 x $1 \mu\text{l}$ virus ; 2.10^9 pi/ml).

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

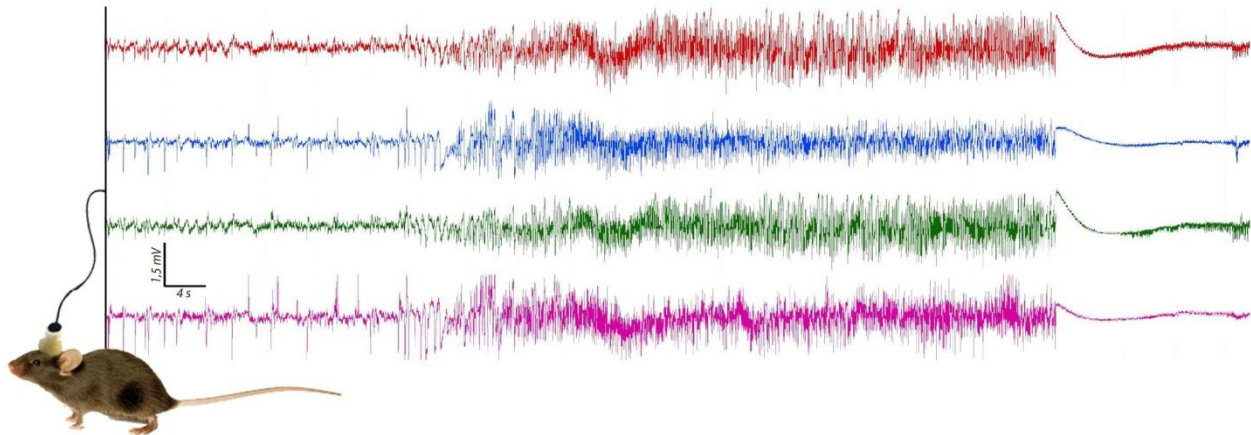


Fig. 66 : Exemple de l'enregistrement d'une crise clonique spontanée avec l'ECoG.

➤ Lors des inductions de crises par augmentation de la température corporelle (hyperthermie ; voir matériel & méthodes) nous n'avons pas distingué de différence dans la sévérité des crises, représentée par l'échelle de Racine (ER), pour les souris injectées avec le vecteur viral contrôle ou avec le vecteur libérant des ARNi contre les canaux Na_v dans les neurones excitateurs (vecteur ctrl. : $ER = 4 \pm 0,4$; vecteur anti Na_v : $ER = 3,9 \pm 0,3$). Bien qu'il semble y avoir une diminution du seuil de température de déclenchement des crises pour les souris injectées avec le virus actif comparée au contrôle, celle-ci n'est pas significative (vecteur ctrl. : $T^\circ \text{ seuil} = 40,5 \pm 0,5$; vecteur anti Na_v : $T^\circ \text{ seuil} = 38,7 \pm 0,6$; *test U de MannWhitney* $p = 0,06$) (Fig. 67).

Induction de crises par hyperthermie sur des souris $Nav1.1+/-$ injectées avec des concentrations et des volumes d'injection élevés de vecteur AAV

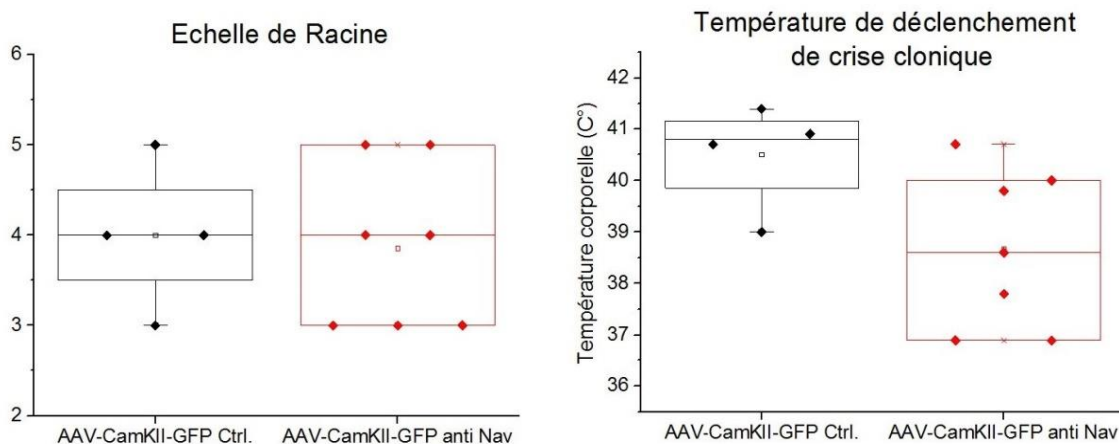


Fig. 67 : Analyse de l'induction des crises par hyperthermie sur des souris injectées avec les titres de particules infectieuses et volumes élevés de vecteurs AAV contrôle et anti Na_v .

Gauche : Box plots de la sévérité des crises notée par l'échelle de Racine ; Droite : Box plots de la température de déclenchement d'une crise clonique. (AAV-Ctrl. $N = 4$ souris ; AAV-anti Na_v $N = 7$ souris)

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

➤ De manière surprenante, l'enregistrement chronique suivant l'induction par hyperthermie semble montrer que les souris $Na_v1.1^{+/-}$ injectées avec le vecteur AAV réduisant l'expression des canaux Na_v dans les neurones excitateurs expriment plus de crises spontanées que les souris injectées avec le vecteur contrôle, mais le test statistique n'est pas significatif (vecteur ctrl. : nombre de crises sur 5 jours = $6,8 \pm 3,3$; vecteur anti Na_v : nombre de crises sur 5 jours = $23,6 \pm 6,3$; test *U de MannWhitney* $p = 0,16$) (Fig. 68).

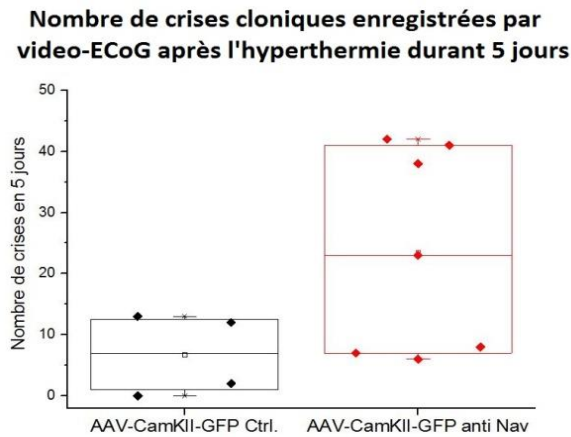


Fig. 68 : Analyse des crises spontanées post-hyperthermie des souris injectées avec les titres de particules infectieuses et volumes élevés de vecteurs AAV contrôle et anti Na_v . Box plots du nombre de crises spontanées sur 5 jours d'enregistrement chronique. (AAV-Ctrl. $N = 4$ souris ; AAV-anti Na_v $N = 7$ souris)

Cette tendance pourrait venir du fait que la concentration du vecteur actif soit 10 fois supérieure à celle du virus contrôle, et de ce fait les virus pourraient agir sur d'autres cibles cellulaires et moléculaires. Il est difficile de vérifier la spécificité à ces volumes et concentrations, car nous n'arrivons pas à distinguer les cellules tant la fluorescence est importante.

Nous supposons donc que le volume d'injection puisse être trop élevé, ainsi que la concentration de particules virales et avons décidé de les diminuer.

- **Ajustement du titre et du volume de vecteur viral**

La fluorescence étant trop intense pour vérifier la spécificité cellulaire des constructions virales, j'ai effectué quelques injections à des titres plus faibles (AAV-CamKII-GFP contrôle : $0,5 \cdot 10^8$ pi/ml ; AAV-CamKII-GFP anti Na_v : $1 \cdot 10^8$ pi/ml) et un volume plus petit (8 fois $0,3 \mu\text{l}$). J'ai ensuite fait des immunomarquages à l'aide d'un anticorps permettant de marquer les neurones inhibiteurs (Ac anti-GABA) et j'ai observé la fluorescence au microscope confocal. Les images révèlent que les cellules GFP+ sont différentes de celles marquées avec l'Ac anti-GABA, que ce soit pour le vecteur AAV contrôle ou pour le vecteur anti Na_v (Fig. 69). Ce qui montre que les constructions de vecteurs AAV ciblent bien spécifiquement les neurones excitateurs *in vivo*. Les volumes et concentrations de vecteurs viraux utilisés ici nous ont permis de vérifier la spécificité des constructions pour les neurones Glutamatergiques, mais ils ne sont pas suffisants pour infecter tout l'hippocampe, voilà pourquoi j'ai ajusté les quantités de virus injectés pour évaluer l'effet des constructions sur les crises *in vivo*.

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

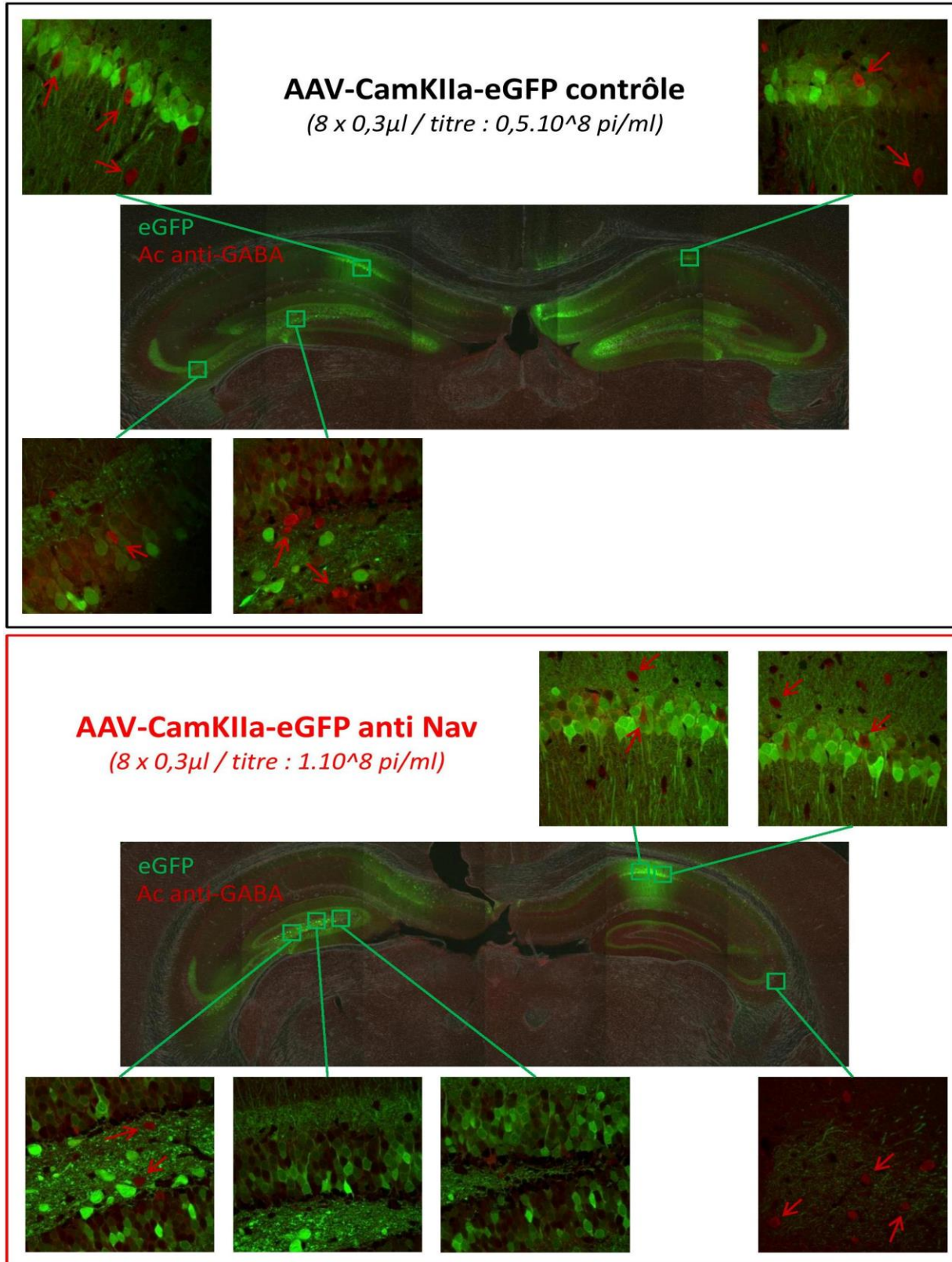


Fig. 69 : Immunomarquages des neurones inhibiteurs dans les tranches de cerveau infectées avec les vecteurs AAV-CamKIIa-GFP-Ctrl. (haut) et AAV-CamKIIa-GFP-anti Nav (bas). L'anticorps anti-GABA révèle que les neurones inhibiteurs (rouge) sont différents des neurones infectés par les constructions virales (GFP+, verts).

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

➤ Après plusieurs essais, j'ai optimisé le volume d'injection ainsi que la concentration des particules virales pour n'infecter que l'hippocampe, avec la même fluorescence pour le virus contrôle et le virus ciblant les canaux Na_v (Fig. 70). Ainsi le volume d'injection est de 8 fois $0,5\mu\text{l}$ et la concentration de 1.10^8 pi/ml pour le vecteur AAV-CamKIIa-eGFP-Neg et 2.10^8 pi/ml pour le vecteur AAV-CamKIIa-eGFP-anti Na_v .

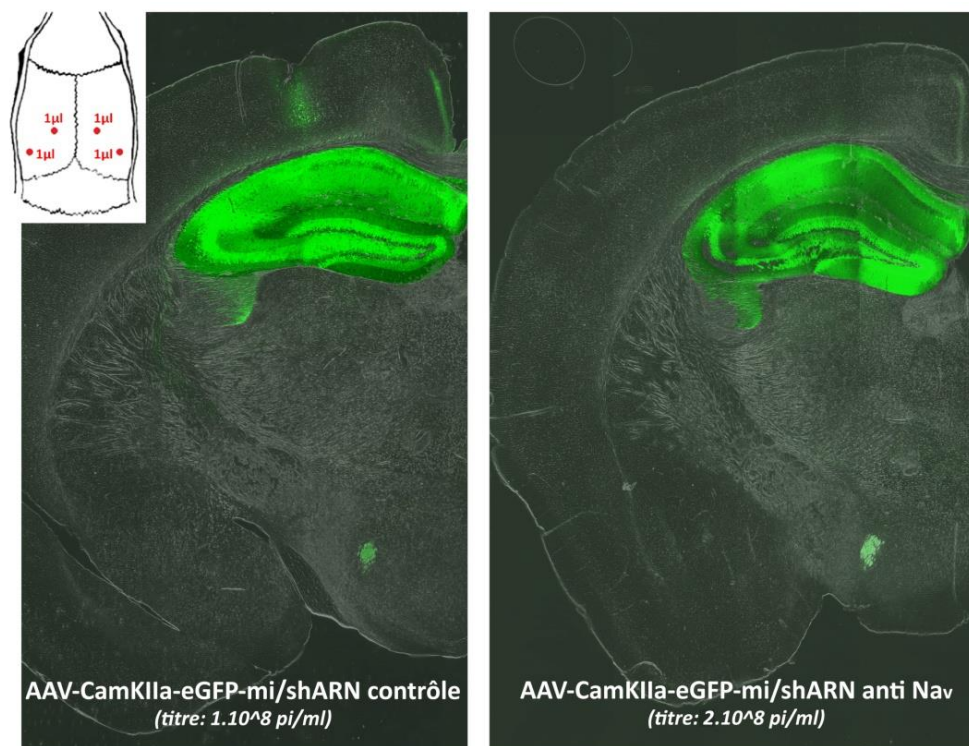


Fig. 70 : Images représentatives de la fluorescence GFP après optimisation des titres infectieux et des volumes d'injection. Les tranches ont été injectées avec un volume de $8 \times 0,5\mu\text{l}$ d'une solution de PBS contenant les vecteurs AAV-CamKIIa-eGFP-Ctrl. à un titre de 1.10^8 pi/ml (gauche) ou contenant les vecteurs AAV-CamKIIa-eGFP-anti Na_v à un titre de 2.10^8 pi/ml (droite) afin d'obtenir une fluorescence similaire pour les deux conditions.

➤ Comme précédemment, les vecteurs viraux ont été injectés aux souris $Na_v1.1^{+/-}$ en utilisant les nouveaux titres de particules infectieuses et volumes d'injection (AAV-CamKIIa-eGFP contrôle : $N = 14$ souris $Na_v1.1^{+/-}$; AAV-CamKIIa-eGFP anti Na_v : $N = 15$ souris $Na_v1.1^{+/-}$). 21 jours après l'injection des vecteurs AAV, les souris ont été enregistrées par vidéo-ECoG pendant 5 jours, puis elles ont été soumises au protocole d'hyperthermie avant d'être de nouveau enregistrées par vidéo-ECoG pendant 5 autres jours (voir matériel & méthodes).

Nous avons analysé la sévérité des crises cloniques induites (Fig. 71A), ainsi que le seuil de température corporelle provoquant le déclenchement de crises (Fig. 71B) et la durée de ces crises (Fig. 71C) sans constater de différence entre les souris injectées avec le virus contrôle ($8 \times 0,5\mu\text{l}$; 1.10^8 pi/ml) et celles injectées avec le virus libérant des ARNi contre les canaux Na_v ($8 \times 0,5\mu\text{l}$; 2.10^8 pi/ml).

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

Induction des crises par hyperthermie sur des souris Nav1.1+/- injectées avec des quantités et concentrations modérées de vecteurs AAV

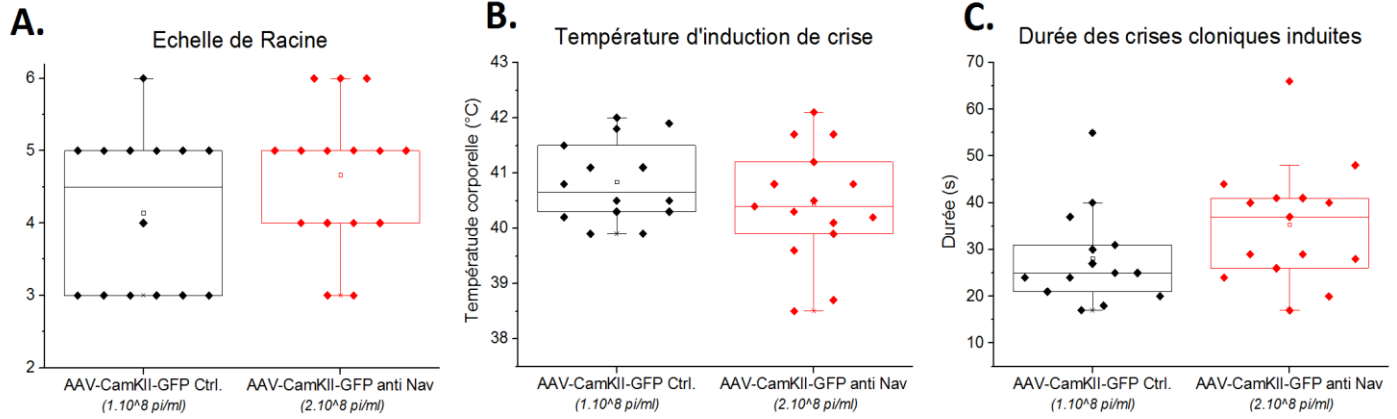


Fig. 71 : Analyse de l'induction des crises par hyperthermie sur des souris injectées avec les titres de particules infectieuses et volumes modérés de vecteurs AAV contrôles et anti Na_v . Gauche : Box plots de la sévérité des crises notée par l'échelle de Racine. Milieu : Box plots de la température de déclenchement d'une crise clonique. Droite : Box plots de la durée des crises cloniques. (AAV-Ctrl. N = 4 souris ; AAV-anti Na_v N = 7 souris)

Nous avons également évalué l'effet chronique de ces constructions virales en enregistrant les crises spontanées grâce au système de vidéo-ECoG pendant 5 jours avant l'induction, puis 5 jours après (voir matériel & méthodes) afin de voir si l'hyperthermie favorise la génération de crises spontanées.

Ainsi, nous ne constatons pas de différence dans le nombre de crises spontanées avant et après l'induction par hyperthermie pour les souris injectées avec le vecteur AAV-CamKIIa-eGFP contrôle ($8,2 \pm 2,9$ crises pendant 5 jours avant l'induction ; $10,7 \pm 2,7$ crises pendant 5 jours après l'induction) et pour les souris injectées avec le vecteur AAV-CamKIIa-eGFP-anti Na_v ($7,3 \pm 3,1$ crises pendant 5 jours avant l'induction ; $9,2 \pm 1,3$ crises pendant 5 jours après l'induction) (Fig. 72).

Crises cloniques spontanées enregistrées via video-ECoG

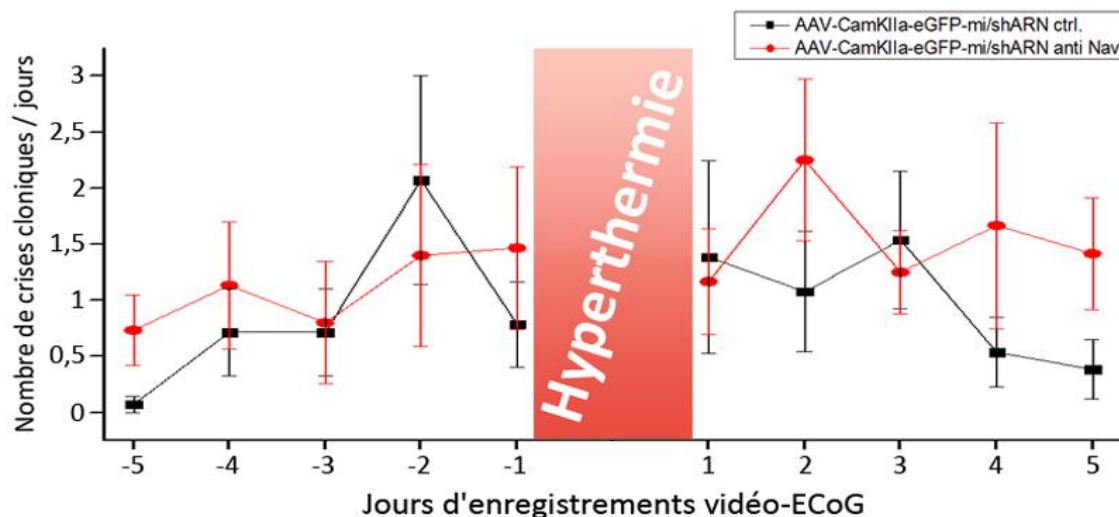


Fig. 72 : Analyse des crises spontanées des souris injectées avec les titres de particules infectieuses et volumes modérés de vecteurs AAV contrôles (1.10^8 pi/ml) et anti Na_v (2.10^8 pi/ml). Graphique du nombre de crises spontanées par jours, pendant 5 jours avant induction par hyperthermie et 5 jours après. (AAV-Ctrl. avant hyperthermie N = 14 souris, après hyperthermie N = 13 souris ; AAV-anti Na_v avant hyperthermie N = 15 souris, après hyperthermie N = 12 souris)

La durée des crises ne semble pas non plus varier entre les souris injectées avec la construction contrôle ou celle permettant de réduire l'expression des canaux Na_v (AAV-CamKII-GFP Contrôle : $43,4 \pm 1,1$ sec par crises ; AAV-CamKII-GFP anti Na_v : $45,4 \pm 1,1$ sec par crise), ni avant et après induction (*résultats non montrés*).

Nous pensons utiliser des vecteurs viraux libérant des ARNi capable de réduire l'expression des canaux Na_v dans les neurones excitateurs du modèle murin du SD afin de réduire l'hyperexcitabilité cérébrale à l'origine de la génération des crises. Bien que nous constatons une bonne spécificité cellulaire des vecteurs viraux *in vivo* et que nous ayons montré que la construction possédant des mi/shARN contre les canaux Na_v était bien capable de réduire les courants sodiques *in vitro*, nous n'observons pas d'effet de cette stratégie sur les crises d'épilepsies dans le modèle murin *in vivo*.

Partie III : Nouvelle stratégie pour réduire l'hyperexcitabilité cérébrale dans le modèle murin du SD

➤ Avec l'aide d'un collaborateur, nous avons décidé d'évaluer l'expression des gènes codant pour les canaux sodiques présents dans le cerveau en prélevant les hippocampes de souris hétérozygotes $Na_v1.1^{+/-}$ injectées avec le vecteur AAV-CamKIIa-eGFP-Neg (N = 3 souris) ou avec le vecteur AAV-CamKIIa-eGFP-anti Na_v (N = 3 souris). Pour cela nous avons effectué des qPCR avec des amorces spécifiques des gènes *Scn1a*, *Scn2a*, *Scn3a* et *Scn8a*, codant respectivement pour les canaux $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ et $Na_v1.6$ (voir matériel & méthodes).

D'après les analyses, il semble y avoir une diminution des gènes codant pour les canaux $Na_v1.1$ (AAV-Ctrl. = $1,17 \pm 0,09$; AAV-anti Na_v = $0,65 \pm 0,07$), $Na_v1.2$ (AAV-Ctrl. = $1,22 \pm 0,11$; AAV-anti Na_v = $0,51 \pm 0,06$) et $Na_v1.3$ (AAV-Ctrl. = $1,14 \pm 0,12$; AAV-anti Na_v = $0,7 \pm 0,09$) dans les hippocampes des souris infectées avec le vecteur AAV-CamKIIa-eGFP-anti Na_v comparé au vecteur contrôle, mais cette réduction n'est pas significative d'après le test statistique de *Mann & Whitney* (Fig. 73).

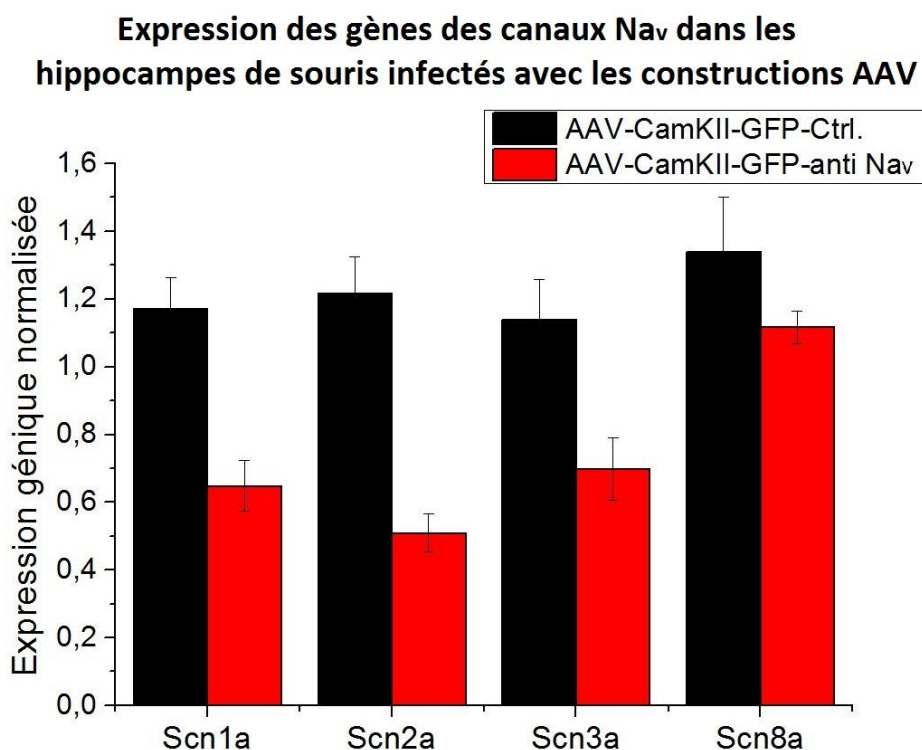


Fig. 73 : Profil d'expression des différents canaux Na_v dans des hippocampes infectés avec les vecteurs AAV. qPCR montrant le niveau d'expression des gènes codant pour les isoformes des canaux Na_v , normalisé par rapport à la β -actine, en utilisant la méthode $d\Delta\Delta C_p$.

Le manque de significativité de la réduction d'expression des canaux Na_v est en accord avec les résultats observés *in vivo*, suggérant que l'expression des canaux Na_v ne soit pas suffisamment réduite dans les neurones excitateurs de l'hippocampe pour induire un effet sur la génération des crises.

Discussion et **Perspectives**

Mes travaux de thèse ont participé à la compréhension de mécanismes impliqués l'épileptogenèse sur des modèles murins de deux épilepsies génétiques dues à des mutations du canal $\text{Na}_v1.1$: l'EGCF+ et le SD. Ils ont également révélés les avantages et les limites d'une étude réalisées sur tranches de cerveaux par rapport à un modèle plus intégré. Et des études préliminaires ont été réalisées quant au développement d'une nouvelle stratégie pour réduire l'excitabilité cérébrale.

1. Etude de la période pré-épileptique

Dans un premier temps, je me suis intéressée à l'étude de l'excitabilité cérébrale dans la période précédant le développement de l'épilepsie sur les modèles murins de l'EGCF+ et du SD.

Des études ont montré que chez des souris sauvages, le canal $\text{Na}_v1.1$ commençait à être exprimé vers 10 jours, que son expression devenait conséquente à partir de deux semaines et continuait d'augmenter jusqu'à trois semaines (Ogiwara et al., 2007). Aussi, dans les modèles murins de l'EGCF+ et du SD qui présentent un dysfonctionnement de ce canal impliqué dans l'excitabilité des interneurons, on s'attend à avoir une perte d'inhibition cérébrale progressive jusqu'au déclenchement des crises spontanées à partir de la troisième semaine (Martin et al., 2010; Yu et al., 2006). C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur la période à partir de laquelle le canal est exprimé mais avant l'apparition des premières crises spontanées (période pré-épileptique), afin de détecter si des modifications du réseau cérébral seraient à l'origine du développement de l'épilepsie dans cette période.

- **Période pré-épileptique du modèle murin de l'EGCF+**

L'étude du modèle murin de l'EGCF+ s'est décomposée en deux parties : l'effet de la mutation à l'échelle du neurone et à l'échelle des réseaux neuronaux. Afin de mieux comprendre les différents mécanismes impliqués, les expériences ont principalement été réalisées sur des tranches de cerveaux prélevées sur des souris âgées de 14 à 20 jours, afin de comparer l'activité pré-épileptique des souris EGCF+ par rapport aux souris contrôles du même âge. D'autres expériences ont également été réalisées sur des neurones corticaux en culture afin d'observer les propriétés des neurones dans un réseau moins intégré ; et sur des cellules embryonnaires de foie humain (tsA210) dans lesquelles les canaux $\text{Na}_v1.1^{\text{RH/+}}$ ont été exprimés afin d'observer l'effet de la mutation à l'échelle d'une cellule isolée.

1) Propriétés intrinsèques des neurones

➤ Dans l'étude du modèle murin de l'EGCF+ en période pré-épileptique, les expériences de patch-clamp réalisées sur des tranches TC et sur des tranches d'hippocampe (prélevées entre 14 et 20 jours) ont révélé que la mutation hétérozygote faux-sens R1648H, qui affecte le canal $\text{Na}_v1.1$, altère spécifiquement la fonction des neurones inhibiteurs en diminuant leur taux de décharge, sans impacter la fonction des

neurones excitateurs. Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée par « [Martin et al., 2010](#) » sur des cultures de neurones corticaux de souris présentant la même mutation, qui avait montré une diminution de l'excitabilité des neurones inhibiteurs alors que les neurones excitateurs n'étaient pas impactés.

➤ D'autres expériences réalisées par nos collaborateurs sur la mutation R1648H des canaux $Na_v1.1$ humains exprimés dans des cellules tsA201 ont montré une réduction de la densité de courant, mais également une stabilisation de « l'inactivation lente ». Contrairement à « l'inactivation rapide » qui survient pour limiter une dépolarisation rapide grâce à la porte d'inactivation, « l'inactivation lente » correspond à des réarrangements structurels du pore du canal qui interviennent lors d'une dépolarisation prolongée, rendant les canaux réfractaires à une nouvelle dépolarisation ([Goldin, 2003](#)). La stabilisation de « l'inactivation lente » rend donc moins excitables les canaux $Na_v1.1$ porteurs de la mutation.

➤ Une analyse plus poussée d'expériences de patch-clamp sur tranche a révélé que la mutation affectait particulièrement l'initiation des PA au niveau du segment initial de l'axone (SIA) des neurones inhibiteurs de tranches TC prélevées entre 14 et 20 jours. Ainsi nous suggérons que la stabilisation de « l'inactivation lente » des canaux $Na_v1.1$ au niveau du SIA, qui réduit le nombre de canaux disponibles lors d'une décharge prolongée, pourrait augmenter la latence entre l'initiation de chaque PA et diminuer le taux de décharge des neurones inhibiteurs.

➤ La machinerie synaptique n'est pas affectée par cette mutation, puisque lorsqu'on bloque l'influx nerveux avec de la TTX, les activités synaptiques spontanées sont identiques pour les neurones inhibiteurs des souris porteuses de la mutation R1648H et ceux des souris contrôles.

Le dysfonctionnement provoqué par la mutation $Na_v1.1^{RH/+}$ conduit donc un défaut de décharge des interneurons qui provoque une réduction du contrôle inhibiteur au sein du réseau cérébral du modèle murin de l'EGCF+. A terme, ce dérèglement provoquera une hyperexcitabilité du réseau cérébral qui se traduira par des crises épileptiques. Cependant afin de mieux comprendre les mécanismes de l'épileptogenèse, nous voulions savoir si une hyperexcitabilité précoce était déjà détectable au sein des réseaux neuronaux avant le déclenchement des premières crises, pouvant être à l'origine par la suite de la génération de l'épilepsie en se propageant à tout le cerveau.

2) Etude des réseaux neuronaux

➤ Des expériences d'enregistrements extracellulaires de neurones corticaux en culture révèlent une synchronisation excessive des neurones provenant des souris porteuses de la mutation hétérozygote R1648H par rapport aux souris sauvages. Ces résultats montrent que la mutation entraîne une hypersynchronisation neuronale au sein d'un réseau primaire.

➤ Nous avons ensuite voulu savoir si l'effet de la mutation était observable sur le réseau cérébral lors de la période précédant le développement de l'épilepsie. Parmi les différents réseaux neuronaux, nous avons

choisi d'étudier le réseau reliant le thalamus au cortex somatosensoriel (boucle TC). Ce réseau est impliqué dans les crises d'absences observées chez les patients atteints d'EGCF+ (Kostopoulos, 2001).

Nos résultats ont révélé des activités spontanées enregistrées au sein du réseau TC des souris porteuses de la mutation hétérozygote R1648H, alors qu'elles sont peu observées dans le réseau des souris sauvages. De plus, ces activités ont de plus grandes amplitudes et sont souvent enregistrées de manière synchrone dans 4 structures de la boucle TC des tranches porteuses de la mutation, alors qu'elles sont plus petites et jamais synchronisées dans le réseau TC des souris sauvages, suggérant qu'il pourrait y avoir un effet de seuil de décharge d'un certain nombre de neurones à atteindre afin de pouvoir diffuser les activités aux autres structures. Ces résultats montrent que la mutation provoque des réarrangements du réseau TC dans le modèle murin de l'EGCF+ conduisant à une forme d'hyperexcitabilité neuronale avant l'apparition des premières crises. De plus les activités épileptiformes spontanées de la boucle TC des souris mutantes possèdent des OHF filtrées à des fréquences pathologiques (200-600 Hz), caractéristiques des activités enregistrées au niveau des foyers épileptiques chez certains patients (Bragin et al., 1999; Jacobs et al., 2012; Jefferys et al., 2012; Zijlmans et al., 2012), révélant la pertinence de ces activités épileptiformes pré-épileptiques observées dans le modèle murin pour l'étude de l'EGCF+.

L'ensemble de ces données met donc en avant des réarrangements neuronaux qui provoquent une hyperexcitabilité du réseau TC détectable avant l'apparition des premières crises. Nous supposons que cette hyperexcitabilité précoce confinée pourrait par la suite se répandre et être à l'origine du déclenchement des crises.

- **Période pré-épileptique du modèle murin du SD**

Dans l'étude du modèle murin du SD dû à la mutation hétérozygote KO du gène *Scn1a*, l'impact fonctionnel de la mutation à l'échelle de la cellule a déjà été mis en évidence. En effet, des enregistrements sur des cultures de neurones d'hippocampe ont révélé une altération des décharges de PA et une réduction des courants sodiques spécifiquement dans les neurones GABAergiques provenant des souris porteuses de la mutation comparé aux neurones des souris sauvages, alors que les neurones excitateurs ne sont pas altérés (Cheah et al., 2012; Yu et al., 2006).

Au cours de ma thèse, nous nous sommes directement intéressés à l'impact de la mutation sur le réseau cérébral dans la période précédant l'apparition de l'épilepsie. Le SD se caractérise par des crises généralisées, mais nous devons choisir un réseau cérébral sur lequel nous focaliser pour effectuer des enregistrements en potentiel de champ. Aussi, nous avons choisi d'étudier le réseau reliant l'hippocampe au cortex entorhinal (réseau Hippocampo-Cortical), qui est un réseau très étudié car de nombreuses épilepsies sont attribuées à un dysfonctionnement de l'hippocampe, telle que l'épilepsie du lobe temporel qui est l'épilepsie la plus fréquente. De plus, de précédentes études sur des modèles murins du SD ont mis en évidence l'altération des neurones inhibiteurs dans le réseau hippocampique (Yu et al., 2006; Cheah et al., 2012) et dans le réseau cortical (Ogiwara et al., 2007).

1) Etude du réseau Hippocampo-Cortical sur tranches en période pré-épileptique

- Les enregistrements extracellulaires du réseau Hippocampo-Cortical en tranche durant la période pré-épileptique a permis de distinguer des activités spontanées ayant une amplitude plus grande dans le réseau des souris $Na_v1.1^{+/-}$ que pour celles détectées dans le réseau des souris WT, bien que ces activités ne possèdent pas de caractéristiques épileptiformes. Les enregistrements extracellulaires correspondent à la sommation des décharges des neurones proches de l'électrode, donc l'amplitude des réponses enregistrées est variable en fonction des tranches et de l'emplacement de l'électrode car le nombre de neurones contribuant à cette réponse est variable. Malgré cela, la différence d'amplitude entre les tranches des souris porteuses de la mutation et des souris sauvages est significative, reflétant une hyperexcitabilité du réseau Hippocampo-Cortical en tranches durant la période pré-épileptique pour le modèle murin du SD.
- Lorsque l'hyperexcitabilité est induite avec une stimulation tétanique appliquée au niveau des collatérales de Schaffer, on observe des réponses plus importantes enregistrées au niveau des corps cellulaires des neurones pyramidaux de la zone CA1 des souris mutantes comparé aux contrôles, mettant en évidence un réseau plus excitable pour les souris porteuses de la mutation. Ces résultats révèlent donc une hyperexcitabilité induite plus importante dans le réseau Hippocampo-Cortical des souris porteuses de la mutation $Na_v1.1^{+/-}$ avant l'apparition de l'épilepsie comparé à l'hyperexcitabilité induite au sein du réseau des souris contrôles. En revanche lorsqu'on administre de la CCK, un neuropeptide qui possède un effet exciteur sur les neurones PV+ (Földy et al., 2007; Lee et al., 2011), on restaure l'hyperexcitabilité observée dans les tranches de cerveau des souris $Na_v1.1^{+/-}$ au même niveau que l'hyperexcitabilité observée dans les souris sauvages suite à une stimulation tétanique. Ce qui suggère que l'augmentation de l'activité des interneurones PV+ par la CCK permet de contrer l'effet de la mutation dans ce modèle d'étude. Dans des expériences futures, la CCK pourrait être administrée *in vivo* en période pré-épileptique pour réduire l'excitabilité cérébrale du modèle murin du SD, en vue d'empêcher l'apparition des premières crises épileptiques.

Le SD étant une épilepsie généralisée, tout le cerveau peut être impacté par les dérèglements dues à la mutation. Puisque la mutation du SD affecte le même gène que la mutation que nous avons étudiée pour l'EGCF+, il serait également intéressant à l'avenir d'observer l'excitabilité du réseau TC en période pré-épileptique pour le modèle murin du SD, puisque nous avons observé des activités spontanées plus marquées dans ce réseau pour le modèle de l'EGCF+.

2) Etude du réseau Hippocampo-Cortical en période pré-épileptique *in vivo*

- Nous avons également enregistré le réseau Hippocampo-Cortical *in vivo* sur des souris anesthésiées à l'uréthane. L'action pharmacologique de cet anesthésique mime les mécanismes physiologiques du maintien dans une phase de sommeil lent (Clement et al., 2008) et l'EEG de patients atteints du SD a déjà révélé des crises épileptiques ou de l'hyperexcitabilité cérébrale lors du sommeil lent (Millichap et al., 2009).

Nous nous sommes basés sur l'article de « [Stasi et al., 2016](#) » dans lequel l'activité du cortex des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$ avait été enregistré en période pré-épileptique. Tout comme les données énoncées dans l'article, nous ne constatons pas de différences entre les activités corticales enregistrées chez les souris WT et celles porteuses de la mutation $Na_v1.1^{+/-}$ à une température physiologique.

Cependant, nous nous sommes intéressés aux mécanismes liés à l'hyperthermie puisque les premières crises des patients sont liées à de la fièvre et nous avons choisi d'enregistrer l'activité en potentiel de champ du cortex et de l'hippocampe car nous avons observé une hyperexcitabilité de ce dernier lors d'enregistrements sur tranches. Aussi nous avons comparé les activités enregistrées dans le cortex et dans l'hippocampe des souris contrôles et $Na_v1.1^{+/-}$ à la température physiologique de 37°C et lors d'une augmentation de température corporelle à 41°C (mimant une fièvre).

Nos analyses ne révèlent aucune différence, que ce soit pour les activités enregistrées dans le cortex ou dans l'hippocampe entre les souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$, quelle que soit la température corporelle. L'augmentation de la température corporelle n'induit pas de variation des activités enregistrées dans le cortex ou l'hippocampe des souris WT et des souris $Na_v1.1^{+/-}$.

Puisque nous avons observé une forme d'hyperexcitabilité au niveau de l'hippocampe des souris $Na_v1.1^{+/-}$ âgées de 16 à 19 jours lors d'enregistrement sur tranches de cerveau, il est surprenant que nous ne retrouvions pas d'hyperexcitabilité lors d'enregistrements de cette structure *in vivo*. Il est possible que, dans un modèle plus intégré que celui de l'étude réalisée sur tranches de cerveaux, des mécanismes d'homéostasie se mettent en place afin de limiter l'hyperexcitabilité due à la mutation durant la période pré-épileptique. En effet, cela peut être dû au fait que l'activité des neurones de l'hippocampe ou du cortex *in vivo* est déclenchée et modulée par des afférences provenant de différents circuits neuronaux qui ne sont pas tous présents dans les tranches de cerveau. En soutenant cette hypothèse, nous supposons que ces mécanismes d'homéostasies ne puissent être suffisants à contenir l'excès d'excitabilité au-delà d'une certaine période, à partir de laquelle les premières crises seraient déclenchées.

Avant de tenter de valider cette hypothèse, nous devons tout de même nous demander si l'uréthane n'induit pas un biais sur l'hyperexcitabilité qui pourrait être détectée dans l'hippocampe, car bien que de nombreuses études aient utilisé cet anesthésique pour étudier les mécanismes de l'épilepsie, celui-ci affecte tout de même les systèmes inhibiteurs et excitateurs au sein du cerveau ([Hara and Harris, 2002](#)). Dans l'étude de « [Stasi et al., 2016](#) », les mêmes enregistrements ont été effectués dans le cortex de souris éveillées, ne révélant aucune différence non plus entre les activités des souris WT et porteuses de la mutation $Na_v1.1^{+/-}$. Il serait donc intéressant à l'avenir de vérifier que les mêmes résultats soient obtenus lors d'enregistrements de l'hippocampe sur souris éveillées.

Ces résultats montrent que les enregistrements sur tranches de cerveau permettent de détecter une hyperexcitabilité précoce qui n'est pas observable lors d'enregistrements *in vivo*, mettant en évidence la pertinence des enregistrements *in vitro* sur tranches pour fournir des informations complémentaires concernant les mécanismes impliqués dans la génération d'activités pathologique au sein des réseaux neuronaux.



Ainsi, l'ensemble de ces résultats révèlent une hyperexcitabilité spontanée dans la boucle TC caractéristique du modèle murin de l'EGCF+ et une hyperexcitabilité, principalement induite dans le modèle murin du SD, mettant en avant des modifications des réseaux neuronaux qui prennent déjà place lors de la période pré-épileptique. On peut alors considérer qu'il y a un phénomène d'épileptogenèse dans ces modèles murins d'épilepsies génétiques, qui aboutira par la suite au développement de crises.

2. Etude de l'épilepsie chronique sur le modèle murin du SD.

Lorsque les crises épileptiques commencent à se manifester de manière récurrente, on parle alors d'épilepsie chronique. Le modèle murin du SD ayant un phénotype plus sévère, nous avons choisi de nous intéresser aux souris porteuses de la mutation hétérozygote KO du gène *Scn1a* pour l'étude de l'hyperexcitabilité cérébrale en période d'épilepsie chronique. Ces souris expriment leurs premières crises spontanées à 21 jours (Yu et al., 2006), nous les avons donc étudiées entre 30 et 36 jours afin de cibler une période où les crises sont devenues récurrentes sans attendre trop longtemps pour limiter le risque de mortalité des souris $Na_v1.1^{+/-}$. Les expériences ont été réalisées sur le réseau reliant l'hippocampe au cortex entorhinal dans des tranches de cerveau prélevées sur le modèle murin du SD et des souris contrôles. Cependant, sur tranches de cerveau, nous ne pouvons généralement pas observer d'activités qui ressemblent aux activités enregistrées avec un EEG lors d'une crise d'épilepsie (dites activités ictales) de manière spontanée (voir livre: Pitkänen et al., 2005). Pour étudier de telles activités, nous devons alors perfuser les tranches avec du Liquide cérebrospinal artificiel (LCSa) composé d'agents favorisant l'hyperexcitabilité du réseau. Afin d'étudier l'effet de traitements permettant de réduire l'hyperexcitabilité sur les tranches des souris WT et $Na_v1.1^{+/-}$, nous devons auparavant trouver un milieu permettant de provoquer de l'hyperexcitabilité ayant des caractéristiques d'activités épileptiformes spécifiquement dans les tranches des souris mutantes par rapport à l'hyperexcitabilité induite dans les tranches de souris WT.

➤ Il convient donc de choisir la méthode d'induction d'hyperexcitabilité qui soit la plus appropriée à l'étude du modèle murin du SD avant de tester l'efficacité de traitements potentiels. Ainsi, nous avons perfusé des tranches Hippocampo-Corticales avec différentes solutions susceptibles d'engendrer des activités épileptiformes (4-AP, « LCSa high K^+ » et « LCSa Mg^{2+} free »). Parmi les activités observées, nous avons observé des activités transitoires (< 2s) qui ressemblent aux activités « interictales » enregistrées sur les EEG de patients épileptiques entre les crises, nous avons également observé des activités plus prononcées (> 10s) ressemblant aux activités « ictales » enregistrées lors d'une crise épileptique, puis nous avons identifié des activités d'une durée intermédiaire entre les activités dites « interictales » et « ictales » (durée comprise entre 2 et 10 s) que nous avons qualifiées de « multicomponents ».

Dans nos conditions expérimentales, la forte concentration en K^+ provoque une hyperexcitabilité très instable, impossible à analyser, alors que le LCSa sans Mg^{2+} provoque des activités épileptiformes bien marquées de type « interictales », « multicomponents » et « ictales » mais sans différence entre les tranches des souris sauvages et mutantes. En revanche, comme l'étude de « [Liautard et al., 2013](#) » l'avait déjà montré, la 4-AP provoque l'apparition d'activités de type « multicomponents », qui ne sont observables que dans les tranches des souris porteuses de la mutation, ce qui en fait le modèle d'induction d'hyperexcitabilité le plus pertinent pour étudier le modèle murin du SD.

D'après les expériences réalisées, les activités « interictales » sont observables dès 30 min de perfusion avec la 4-AP et tout au long de l'expérience dans le SR CA1 et les activités « ictales » apparaissent dans le CE à partir de 30 min de perfusion dans les tranches des souris sauvages et porteuses de la mutation $Na_v1.1^{+/-}$. En revanche, dans les tranches des souris mutantes, les activités « ictales » laissent ensuite place aux activités « multicomponents » (à partir de 50 min de perfusion) dans le CE. On peut donc supposer que les activités « multicomponents » sont une évolution des activités « ictales » dues à des réarrangements au sein du réseau Hippocampo-Cortical des souris $Na_v1.1^{+/-}$.

➤ Ce modèle d'induction d'activités épileptiformes peut donc être utilisé pour étudier les mécanismes impliqués dans l'hyperexcitabilité du réseau Hippocampo-Cortical sur le modèle murin du SD. Toutefois, pour tester l'effet de divers traitements sur l'hyperexcitabilité induite par la 4-AP dans les tranches des souris mutantes (particulièrement sur les activités épileptiformes de type « multicomponents »), nous devons auparavant vérifier qu'un antiépileptique, dont l'effet est connu sur les patients atteints du DS, induise des résultats similaires dans les conditions d'hyperexcitabilité sur tranches provenant des souris porteuses de la mutation $Na_v1.1^{+/-}$. Nous avons choisi de perfuser les tranches avec de la carbamazépine (CBZ), un MAE qui stabilise la conformation « inactive » des canaux Na_v et qui a la particularité d'aggraver les crises épileptiques chez la plupart des patients atteints du SD ([Xu et al., 2014](#); [Snoeijen-Schouwenaars et al., 2015](#); [Shi et al., 2016](#); [Wirrell, 2016](#)). On s'attendait donc à voir une exacerbation des activités induites par la 4-AP dans les tranches des souris $Na_v1.1^{+/-}$, cependant les effets de la CBZ sont difficiles à interpréter. En effet dans les tranches des souris $Na_v1.1^{+/-}$, on observe une augmentation de la fréquence et une diminution de la durée des activités « interictales », les activités « ictales » sont abolies et il n'y a pas d'effet sur les activités multicomponents. Dans les tranches des souris sauvages la CBZ provoque une réduction des activités « ictales », mais l'apparition d'activités « multicomponents ». Il est donc difficile de conclure si la CBZ provoque une aggravation ou une diminution de l'hyperexcitabilité induite par la 4-AP, puisque l'effet observé sur les différents types d'activités dans les tranches des souris mutantes est contradictoire et il est difficile d'appréhender l'effet de ce traitement sur les activités induites dans les tranches des souris sauvages. De plus, le fait de ne pas observer d'aggravation des activités épileptiformes de type « multicomponents » dans les tranches des souris mutantes n'est pas en accord avec l'effet aggravant observé chez les patients atteints du SD. Ces résultats suggèrent que les conditions d'induction d'hyperexcitabilité sur tranche ne reproduisent pas parfaitement les mécanismes complexes observés dans un modèle plus intégré.

Bien que l'étude du modèle d'induction d'hyperexcitabilité sur tranches puisse fournir des informations sur l'excitabilité du réseau, ce n'est pas le modèle le plus fidèle à la pathologie humaine pour tester l'effet

d'éventuels traitements. Aussi, pour la dernière partie de la thèse, nous avons décidé de commencer à évaluer l'effet d'une stratégie visant à réduire l'excitabilité cérébrale directement sur les crises *in vivo* plutôt que d'utiliser les tranches de cerveau, afin d'obtenir l'effet le plus fidèle à celui qui pourrait être observable chez les patients atteints par le SD. L'étude de cette stratégie « thérapeutique » sur les tranches pourrait fournir des informations supplémentaires dans des expériences futures.

3. Développement d'une stratégie visant à réduire l'hyperexcitabilité du modèle murin du SD

Pour finir, nous avons tenté de développer une stratégie visant à réduire l'excitabilité cérébrale responsable des crises épileptiques. Pour cela, nous voulions restaurer l'équilibre de l'excitation/inhibition cérébrale en réduisant sélectivement l'activité des neurones excitateurs, afin de contrebalancer le manque d'inhibition due à la mutation $Na_v1.1^{+/-}$ qui affecte les neurones inhibiteurs. Nous avons donc développé des ARN interférents ciblant les canaux Na_v (responsables de l'excitabilité neuronale), ne s'exprimant que dans les neurones excitateurs grâce à un promoteur spécifique, délivrés dans les cellules neuronales grâce à des vecteurs viraux. Nous avons testé l'effet de cette stratégie *in vivo*.

- **Développement et validation des constructions.**

Comme nous venons de le voir, les deux épilepsies génétiques que nous étudions sont dues à des mutations du canal $Na_v1.1$, altérant l'activité des neurones inhibiteurs et créant une perte de l'inhibition du réseau cérébral à l'origine de la génération des crises. La plupart des MAE agissent en réduisant l'activité des canaux Na_v (ex : Phénytoïne, Carbamazépine), mais sans pouvoir cibler différents types cellulaires. Aussi dans des épilepsies telles que l'EGCF+ et le SD, pour lesquelles les neurones inhibiteurs sont moins actifs, ce type d'antiépileptiques réduit l'excitabilité de tout le réseau cérébral en agissant à la fois sur les neurones excitateurs et inhibiteurs, mais le déséquilibre est maintenu. Afin de contrebalancer ce déséquilibre, nous voulions développer une stratégie permettant de réduire spécifiquement l'excitabilité des neurones excitateurs.

➤ Dans ce but, nous avons tout d'abord développé des ARNi hybrides, appelés « mi/shARN » permettant de réduire l'expression des canaux Na_v . L'efficacité de ces constructions a été validée *in vitro* révélant une diminution de l'expression de canaux Na_v et une diminution des courants sodiques dans les neurones corticaux en culture transfectés avec ces constructions mi/shARN comparé aux neurones infectés avec des constructions contrôles, contenant une séquence « brouillée ».

➤ Nous avons ensuite introduit ces constructions dans des vecteurs viraux afin de pouvoir infecter les cellules neuronales. Nous avons initialement validé l'efficacité des constructions insérées dans un vecteur lentiviral en infectant des neurones corticaux en culture. En effet, pour les neurones infectés avec les

lentivirus transportant les mi/shARN ciblant les canaux Na_v , nous avons observé une diminution du marquage des canaux Na_v au niveau du SIA, une réduction des courants sodiques et de la fréquence de décharge comparée aux neurones infectés par les vecteurs lentiviraux transportant les constructions contrôles. Cependant, la limite fonctionnelle des vecteurs lentiviraux est de ne pas avoir une grande capacité de dispersion et de ne pas pouvoir cibler un large volume cérébral. Nous avons donc décidé d'utiliser la même stratégie dans des vecteurs viraux adéno-associés (AAV) qui sont plus petits et possèdent une meilleure capacité de diffusion à travers les tissus (Packer et al., 2013; Parr-Brownlie et al., 2015) afin de pouvoir cibler tout l'hippocampe des souris lors des injections *in vivo*.

➤ Nous avons inséré en amont de ces constructions un promoteur CamKIIa, car cette protéine est spécifiquement exprimée dans les neurones excitateurs (Zhang et al., 2010). Cependant, lorsque nous avons testé l'infection de neurones corticaux en culture avec les vecteurs AAV possédant le promoteur CamKIIa, la spécificité pour les neurones excitateurs n'était pas complète. Il se trouve que tous les essais que nous avons effectués avec différents promoteurs (qui ne sont pas détaillés) ont révélé des problèmes de spécificité cellulaire *in vitro*. En revanche, l'étude de « Zhang et al., 2010 » a montré une bonne spécificité du promoteur CamKIIa pour les neurones excitateurs dans des expériences réalisées *in vivo*. Nous supposons donc que les cultures de neurones primaires ne sont pas un modèle adéquat pour tester la spécificité des promoteurs pour des sous-populations de neurones. Nous avons donc décidé de tester l'efficacité des constructions directement en les injectant dans le cerveau de modèles murins *in vivo*. Après avoir adapté le volume injecté et le titre des particules virales permettant d'observer la spécificité cellulaire *in vivo*, nous avons pu distinguer une expression des constructions dans les cellules GABA-négatives (les cellules marquées par le GABA correspondant aux neurones inhibiteurs). Ces données montrent que les vecteurs AAV contenant le promoteur CamKIIa (exprimant les mi/shARN contre les canaux Na_v ou les constructions contrôles) sont exprimées spécifiquement dans les neurones excitateurs.

Ces résultats valident donc l'efficacité de la stratégie pour réduire l'activité des neurones excitateurs spécifiquement dans les neurones excitateurs. Nous avons ensuite évalué l'effet de cette stratégie sur les crises épileptiques du modèle murin *in vivo*.

• Effet des constructions *in vivo*

Le Syndrome de Dravet (SD) se caractérise par un phénotype plus sévère que l'EGCF+ puisqu'on retrouve de violentes crises cloniques mais également d'autres symptômes qui apparaissent au cours du développement tels que des déficiences mentales, des troubles sociaux, des ataxies et un taux de mortalité plus élevé (Singh et al., 2001). De plus à ce jour, aucun traitement n'a montré de réelle efficacité sur le SD, nous avons donc choisi de tester notre stratégie visant à réduire l'excitabilité des neurones excitateurs sur le modèle murin du SD. Les vecteurs viraux ne pouvant pas cibler tout le cerveau, nous avons choisi de les injecter au niveau de l'hippocampe, car comme nous l'avons détaillé plus haut, cette structure est très étudiée pour son implication dans l'épilepsie et nous avons vu de l'hyperexcitabilité dans les enregistrements effectués sur tranches d'hippocampe pour le modèle murin du SD. De plus, dans une étude réalisée récemment au

laboratoire, des électrodes ont été implantées au niveau de l'hippocampe et du cortex de souris $Na_v1.1^{+/-}$ et l'activité cérébrale a été enregistrée lors de l'induction de crises par hyperthermie, révélant que l'activité pré-ictale était d'abord détectée dans l'hippocampe avant le cortex (Liutard et al., 2013). L'hippocampe pourrait donc être impliqué dans la génération des crises du modèle murin du SD.

➤ Les vecteurs viraux ont été produits par le « laboratoire d'amplification de vecteurs du CHU de Nantes » à des titres élevés : 2.10^8 particules infectieuses (pi)/ml pour le vecteur AAV-CamKII-GFP-contrôle et 2.10^9 pi/ml pour le vecteur AAV-CamKII-GFP-anti Na_v . Lors d'expériences préliminaires, j'ai injecté un volume important de ces vecteurs dans les hippocampes (4 μ l par hippocampe) de souris hétérozygotes pour la mutation $Na_v1.1^{+/-}$ afin de voir la dispersion des constructions à de forts titres et volume d'injection. Les résultats ont montré une fluorescence très intense ciblant l'hippocampe et diffusant également dans le cortex, rendant difficile l'observation de cellules isolées. On distingue une forte fluorescence de la couche granulaire du gyrus denté sur toutes les tranches observées, ainsi qu'au niveau du stratum pyramidale (SP) CA3, alors que le SP CA1 n'est pas toujours fluorescent en fonction des tranches pour les 2 vecteurs viraux (contenant les ARNi actifs ou avec la séquence brouillée). La fluorescence et la diffusion au cortex sont légèrement plus importantes pour le vecteur AAV-CamKII-GFP-anti Na_v puisque celui-ci est dix fois plus concentré que le vecteur AAV-CamKII-GFP-contrôle. Après 2 à 3 semaines de repos, les souris semblent stressées, qu'elles aient été injectées avec les constructions contrôles ou ciblant les canaux Na_v . L'analyse des crises induites ou spontanées ne révèle pas de différence significative entre les deux groupes, bien que l'on note une tendance à ce que les souris injectées avec le vecteur AAV-CamKII-GFP-anti Na_v expriment plus de crises que celles injectées avec le vecteur contrôle. Nous pensons que cela peut venir du fait que les particules virales sont dix fois plus concentrées que pour les constructions contrôles. En effet, un volume trop important et une concentration de vecteurs viraux trop élevés sont susceptibles d'induire une pression intracrânienne et une inflammation des cellules infectées, favorisant le stress et la génération de crises. Bien que ces expériences nous aient permis de valider l'expression des vecteurs *in vivo*, nous avons donc décidé de d'optimiser les conditions d'injections des vecteurs viraux.

➤ Nous avons réduit les volumes d'injection et les titres de particules virales afin de ne cibler que l'hippocampe et de pouvoir distinguer les cellules infectées au microscope avec la même fluorescence pour la construction AAV-CamKII-GFP-anti Na_v et AAV-CamKII-GFP-contrôle.

Après plusieurs essais, nous avons retenu les titres de 1.10^8 pi/ml pour le vecteur AAV-CamKII-GFP-contrôle et 2.10^8 pi/ml pour le vecteur AAV-CamKII-GFP-anti Na_v , injectés à un volume de 2 μ l par hippocampe. Ces nouvelles conditions permettent d'observer une bonne fluorescence dans tout l'hippocampe, bien que lorsqu'on regarde plus en détails le SP CA1 soit peu infecté par les constructions contrairement au CA3 et au gyrus denté.

Après 2 à 3 semaines de repos, les souris ne semblent pas stressées comme précédemment. Malheureusement l'analyse des crises n'a révélé aucune différence entre les deux groupes que ce soit pour les crises induites par hyperthermie ou pour les crises spontanées enregistrées 5 jours avant l'hyperthermie et 5 jours après. Dans nos conditions expérimentales, la construction réduisant l'expression des canaux Na_v

dans les neurones excitateurs infectés ne permet donc pas de réduire la fréquence ou la sévérité des crises du modèle murin du SD.

➤ Afin de comprendre pourquoi notre stratégie n'a pas eu l'effet escompté, nous avons évalué l'expression des gènes codant pour les canaux Na_v dans les hippocampes de souris infectées avec les constructions virales AAV-CamKIIa-GFP-contrôle (1.10^8 pi/ml) et AAV-CamKIIa-GFP-anti Na_v (2.10^8 pi/ml). Les résultats ont révélé une légère réduction de l'expression des gènes codant pour les canaux $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ dans les hippocampes infectés avec la construction active par rapport aux contrôles, mais celle-ci n'est pas significative.

On peut donc supposer que bien que nos constructions permettent de réduire l'expression des canaux Na_v spécifiquement dans les neurones excitateurs, son action n'est pas suffisante pour avoir un effet sur les crises épileptiques. Différentes hypothèses peuvent supporter ce manque d'effet :

- 1) La réduction d'expression des canaux Na_v dans les cellules n'est peut-être pas suffisante pour réduire l'activité des neurones *in vivo*.
- 2) Le nombre de cellules infectées n'est peut-être pas suffisant pour réduire l'excitabilité du réseau.
- 3) Une homéostasie pourrait se mettre en place dans les cellules non-infectées afin de contrecarrer la réduction des Na_v dans les cellules infectées.
- 4) Le fait de ne cibler que l'hippocampe n'est peut être pas suffisant pour maîtriser la génération des crises généralisées.

Cette stratégie, bien que prometteuse, doit donc être améliorée. Des expériences de patch-clamp et d'enregistrements en potentiel de champ permettraient de répondre aux trois premières hypothèses et des essais d'injection des constructions virales au niveau du cortex pourraient donner des informations sur la dernière hypothèse.

4. Conclusion

Les différents points d'études abordés dans ma thèse ont donc permis une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la génération de deux épilepsies génétiques dues à la mutation du canal $Na_v1.1$ sur des modèles murins, soulignant l'impact de ce canal dans l'excitabilité cérébrale ; mais également la pertinence qu'apporte un modèle sur tranches par rapports aux données obtenues sur cerveau entier dans nos conditions expérimentales. Enfin, une première avancée a été réalisée pour développer une stratégie pour réduire l'excitabilité cérébrale.

D'après l'étude des modèles murins d'épilepsie génétiques, un phénomène d'épileptogénèse serait à l'origine du développement des crises dans l'EGCF+ et le SD. Cette information pourrait permettre de développer des outils de diagnostic précoce d'hyperexcitabilité cérébrale chez des enfants porteurs de la mutation du canal $Na_v1.1$, afin de pouvoir optimiser les traitements dès l'apparition des premières crises, voire même d'envisager un jour l'utilisation de traitements préventifs.

Parmi les nombreux modèles qui existent pour étudier l'épilepsie chronique, nous avons vu que dans nos conditions expérimentales, l'utilisation de tranches de cerveaux du modèle murin du SD, sur lesquelles nous avons induit de l'hyperexcitabilité, n'est pas adéquat pour étudier l'effet d'éventuels traitements. Ces modèles d'inductions peuvent fournir des informations sur l'hyperexcitabilité du réseau, mais ne semblent pas refléter toute la complexité des mécanismes impliqués dans la génération des crises épileptiques. Nous préconisons donc de préférer l'étude *in vivo* pour tester l'efficacité de traitements et de n'utiliser les modèles sur tranches que pour obtenir des informations supplémentaires sur des mécanismes plus isolés.

Enfin, le développement de la stratégie visant à réduire l'hyperexcitabilité responsable de la génération des crises n'a pas révélé d'effet sur les crises épileptiques du modèle murin du SD dans nos conditions expérimentales. Elle a cependant montré une bonne efficacité à réduire l'expression des canaux Na_v dans les neurones excitateurs. Bien que nous ayons apporté la preuve de concept de cette stratégie à l'échelle du neurone, il reste à comprendre pourquoi celle-ci ne suffit pas à permettre un effet au niveau des réseaux cérébraux. Dans l'avenir, l'optimisation de cette stratégie pourrait permettre son utilisation dans d'autres études sur l'épilepsie ou même sur d'autres pathologies, fournissant des informations essentielles à la compréhension de mécanismes pathologiques en découvrant de nouvelles cibles thérapeutiques.

Bibliographie

Agmon, A., and Connors, B.W. (1991). Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex *in vitro*. *Neuroscience* 41, 365–379.

Akiyama, M., Kobayashi, K., and Ohtsuka, Y. (2012). Dravet syndrome: a genetic epileptic disorder. *Acta Med. Okayama* 66, 369–376.

Anderson, W.W., Lewis, D.V., Swartzwelder, H.S., and Wilson, W.A. (1986). Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 398, 215–219.

Avoli, M. (1990). Epileptiform discharges and a synchronous GABAergic potential induced by 4-aminopyridine in the rat immature hippocampus. *Neurosci. Lett.* 117, 93–98.

Avoli, M., and de Curtis, M. (2011). GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *Prog. Neurobiol.* 95, 104–132.

Baraban, S.C., Dinday, M.T., and Hortopan, G.A. (2013). Drug screening in *Scn1a* zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nat. Commun.* 4, 2410.

Baulac, S., Gourfinkel-An, I., Nabbout, R., Huberfeld, G., Serratosa, J., Leguern, E., and Baulac, M. (2004). Fever, genes, and epilepsy. *Lancet Neurol.* 3, 421–430.

Bechi, G., Scalmani, P., Schiavon, E., Rusconi, R., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2012). Pure haploinsufficiency for Dravet syndrome Na(V)1.1 (SCN1A) sodium channel truncating mutations. *Epilepsia* 53, 87–100.

Bechi, G., Rusconi, R., Cestèle, S., Striano, P., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2015). Rescuable folding defective NaV1.1 (SCN1A) mutants in epilepsy: Properties, occurrence, and novel rescuing strategy with peptides targeted to the endoplasmic reticulum. *Neurobiol. Dis.* 75, 100–114.

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.

Bragin, A., Engel, J., Wilson, C.L., Fried, I., and Mathern, G.W. (1999). Hippocampal and Entorhinal Cortex High-Frequency Oscillations (100–500 Hz) in Human Epileptic Brain and in Kainic Acid-Treated Rats with Chronic Seizures. *Epilepsia* 40, 127–137.

- Bureau, M., and Bernardina, B.D. (2011). Electroencephalographic characteristics of Dravet syndrome. *Epilepsia* 52, 13–23.
- Buzsáki, G. (2015). Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* 25, 1073–1188.
- Camfield, P., and Camfield, C. (2015). Febrile seizures and genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+). *Epileptic Disord. Int. Epilepsy J. Videotape* 17, 124–133.
- Campbell, A.M., and Holmes, O. (1984). Bicuculline epileptogenesis in the rat. *Brain Res.* 323, 239–246.
- Canan, S., Ankarali, S., and Marangoz, C. (2008). Detailed spectral profile analysis of penicillin-induced epileptiform activity in anesthetized rats. *Epilepsy Res.* 82, 7–14.
- Catterall, W.A. (2000). From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* 26, 13–25.
- Catterall, W.A., Kalume, F., and Oakley, J.C. (2010). NaV1.1 channels and epilepsy. *J. Physiol.* 588, 1849–1859.
- Chang, A., Lad, E.M., and Lad, S.P. (2007). Hippocrates' influence on the origins of neurosurgery. *Neurosurg. Focus* 23, E9.
- Cheah, C.S., Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Kalume, F.K., Oakley, J.C., Potter, G.B., Rubenstein, J.L., and Catterall, W.A. (2012). Specific deletion of NaV1.1 sodium channels in inhibitory interneurons causes seizures and premature death in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 14646–14651.
- Claes, L., Del-Favero, J., Ceulemans, B., Lagae, L., Van Broeckhoven, C., and De Jonghe, P. (2001). De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene SCN1A Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1327–1332.
- Claes, L., Audenaert, D., Deprez, L., Van Paesschen, W., Depondt, C., Goossens, D., Del-Favero, J., Van Broeckhoven, C., and De Jonghe, P. (2004). Novel locus on chromosome 12q22–q23.3 responsible for familial temporal lobe epilepsy associated with febrile seizures. *J. Med. Genet.* 41, 710–714.
- Clement, E.A., Richard, A., Thwaites, M., Ailon, J., Peters, S., and Dickson, C.T. (2008). Cyclic and Sleep-Like Spontaneous Alternations of Brain State Under Urethane Anaesthesia. *PLoS ONE* 3.
- D'Antuono, M., Köhling, R., Ricalzone, S., Gotman, J., Biagini, G., and Avoli, M. (2010). Antiepileptic drugs abolish ictal but not interictal epileptiform discharges in vitro. *Epilepsia* 51, 423–431.
- Depienne, C., Trouillard, O., Saint-Martin, C., Gourfinkel-An, I., Bouteiller, D., Carpentier, W., Keren, B., Abert, B., Gautier, A., Baulac, S., et al. (2009). Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J. Med. Genet.* 46, 183–191.

Dravet, C. (2011). The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia* 52, 3–9.

Dravet, C., Bureau, M., Oguni, H., Fukuyama, Y., and Cokar, O. (2005). Severe myoclonic epilepsy in infancy: Dravet syndrome. *Adv. Neurol.* 95, 71–102.

Duflocq, A., Le Bras, B., Bullier, E., Couraud, F., and Davenne, M. (2008). Nav1.1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 180–192.

Dutton, S.B., Makinson, C.D., Papale, L.A., Shankar, A., Balakrishnan, B., Nakazawa, K., and Escayg, A. (2013). Preferential inactivation of *Scn1a* in parvalbumin interneurons increases seizure susceptibility. *Neurobiol. Dis.* 0, 211–220.

Escayg, A., MacDonald, B.T., Meisler, M.H., Baulac, S., Huberfeld, G., An-Gourfinkel, I., Brice, A., LeGuern, E., Moulard, B., Chaigne, D., et al. (2000). Mutations of *SCN1A*, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat. Genet.* 24, 343–345.

Escayg, A., Heils, A., MacDonald, B.T., Haug, K., Sander, T., and Meisler, M.H. (2001). A Novel *SCN1A* Mutation Associated with Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus—and Prevalence of Variants in Patients with Epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 866–873.

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.

Földy, C., Lee, S.Y., Szabadics, J., Neu, A., and Soltesz, I. (2007). Cell type-specific gating of perisomatic inhibition by cholecystokinin. *Nat. Neurosci.* 10, 1128–1130.

Freund, T.F. (2003). Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci.* 26, 489–495.

Gaitatzis, A., Carroll, K., Majeed, A., and Sander, J.W. (2004). The Epidemiology of the Comorbidity of Epilepsy in the General Population. *Epilepsia* 45, 1613–1622.

Gallopini, T., Geoffroy, H., Rossier, J., and Lambolez, B. (2006). Cortical Sources of CRF, NKB, and CCK and Their Effects on Pyramidal Cells in the Neocortex. *Cereb. Cortex* 16, 1440–1452.

Gloor, P. (1968). Generalized Cortico-Reticular Epilepsies Some Considerations on the Pathophysiology of Generalized Bilaterally Synchronous Spike and Wave Discharge. *Epilepsia* 9, 249–263.

Goldin, A.L. (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 284–290.

Guerrini, R., Belmonte, A., and Genton, P. (1998). Antiepileptic drug-induced worsening of seizures in children. *Epilepsia* 39 Suppl 3, S2-10.

Guerrini, R., Marini, C., and Mantegazza, M. (2014). Genetic Epilepsy Syndromes Without Structural Brain Abnormalities: Clinical Features and Experimental Models. *Neurotherapeutics* *11*, 269–285.

de Guzman, P.H., Nazer, F., and Dickson, C.T. (2010). Short-duration epileptic discharges show a distinct phase preference during ongoing hippocampal slow oscillations. *J. Neurophysiol.* *104*, 2194–2202.

Hara, K., and Harris, R.A. (2002). The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth. Analg.* *94*, 313–318, table of contents.

Hauser, W.A., and Kurland, L.T. (1975). The Epidemiology of Epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 Through 1967. *Epilepsia* *16*, 1–66.

Hedrich, U.B.S., Liautard, C., Kirschenbaum, D., Pofahl, M., Lavigne, J., Liu, Y., Theiss, S., Slotta, J., Escayg, A., Dihné, M., et al. (2014). Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Na(V)1.1 mutation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 14874–14889.

Higurashi, N., Uchida, T., Lossin, C., Misumi, Y., Okada, Y., Akamatsu, W., Imaizumi, Y., Zhang, B., Nabeshima, K., Mori, M.X., et al. (2013). A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol. Brain* *6*, 19.

Hille, B. (1989). Ionic Channels: Evolutionary Origins and Modern Roles. *Q. J. Exp. Physiol.* *74*, 785–804.

Hogan, R.E., and English, E.A. (2012). Epilepsy and brain function: Common ideas of Hughlings-Jackson and Wilder Penfield. *Epilepsy Behav.* *24*, 311–313.

Hotta, H., Watanabe, N., Orman, R., and Stewart, M. (2010). Efferent and afferent vagal actions on cortical blood flow and kainic acid-induced seizure activity in urethane anesthetized rats. *Auton. Neurosci.* *156*, 144–148.

Ito, S., Ogiwara, I., Yamada, K., Miyamoto, H., Hensch, T.K., Osawa, M., and Yamakawa, K. (2013). Mouse with Nav1.1 haploinsufficiency, a model for Dravet syndrome, exhibits lowered sociability and learning impairment. *Neurobiol. Dis.* *49*, 29–40.

Jacobs, J., Staba, R., Asano, E., Otsubo, H., Wu, J.Y., Zijlmans, M., Mohamed, I., Kahane, P., Dubeau, F., Navarro, V., et al. (2012). High-frequency oscillations (HFOs) in clinical epilepsy. *Prog. Neurobiol.* *98*, 302–315.

Jansen, F.E., Sadleir, L.G., Harkin, L.A., Vadlamudi, L., McMahon, J.M., Mulley, J.C., Scheffer, I.E., and Berkovic, S.F. (2006). Severe myoclonic epilepsy of infancy (Dravet syndrome): recognition and diagnosis in adults. *Neurology* *67*, 2224–2226.

- Jefferys, J.G.R., Menendez de la Prida, L., Wendling, F., Bragin, A., Avoli, M., Timofeev, I., and Lopes da Silva, F.H. (2012). Mechanisms of physiological and epileptic HFO generation. *Prog. Neurobiol.* *98*, 250–264.
- Jette, N., Beghi, E., Hesdorffer, D., Moshé, S.L., Zuberi, S.M., Medina, M.T., and Bergen, D. (2015). ICD coding for epilepsy: Past, present, and future—A report by the International League Against Epilepsy Task Force on ICD codes in epilepsy. *Epilepsia* *56*, 348–355.
- Kalume, F., Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2007). Reduced Sodium Current in Purkinje Neurons from NaV1.1 Mutant Mice: Implications for Ataxia in Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy. *J. Neurosci.* *27*, 11065–11074.
- Kearney, J. (2013). Sudden Unexpected Death in Dravet Syndrome. *Epilepsy Curr.* *13*, 264–265.
- Khair, A.M., and Elmagrabi, D. (2015). Febrile Seizures and Febrile Seizure Syndromes: An Updated Overview of Old and Current Knowledge. *Neurol. Res. Int.* *2015*.
- Khazipov, R., and Holmes, G.L. (2003). Synchronization of Kainate-Induced Epileptic Activity via GABAergic Inhibition in the Superfused Rat Hippocampus In Vivo. *J. Neurosci.* *23*, 5337–5341.
- Kim, D.H., and Rossi, J.J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 173–184.
- Klausberger, T., Marton, L.F., O’Neill, J., Huck, J.H.J., Dalezios, Y., Fuentealba, P., Suen, W.Y., Papp, E., Kaneko, T., Watanabe, M., et al. (2005). Complementary Roles of Cholecystokinin- and Parvalbumin-Expressing GABAergic Neurons in Hippocampal Network Oscillations. *J. Neurosci.* *25*, 9782–9793.
- Korn, S.J., Giacchino, J.L., Chamberlin, N.L., and Dingledine, R. (1987). Epileptiform burst activity induced by potassium in the hippocampus and its regulation by GABA-mediated inhibition. *J. Neurophysiol.* *57*, 325–340.
- Kostopoulos, G.K. (2001). Involvement of the thalamocortical system in epileptic loss of consciousness. *Epilepsia* *42 Suppl 3*, 13–19.
- Lee, S.Y., Földy, C., Szabadics, J., and Soltesz, I. (2011). Cell-Type Specific CCK2 Receptor Signaling Underlies the Cholecystokinin-Mediated Selective Excitation of Hippocampal Parvalbumin-Positive Fast-Spiking Basket Cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 10993–11002.
- Leschinger, A., Stabel, J., Igelmund, P., and Heinemann, U. (1993). Pharmacological and electrographic properties of epileptiform activity induced by elevated K⁺ and lowered Ca²⁺ and Mg²⁺ concentration in rat hippocampal slices. *Exp. Brain Res.* *96*, 230–240.
- Lewis, D.V., Jones, L.S., and Mott, D.D. (1990). Hippocampal epileptiform activity induced by magnesium-free medium: differences between areas CA1 and CA2–3. *Epilepsy Res.* *6*, 95–101.

- Liautard, C., Scalmani, P., Carriero, G., de Curtis, M., Franceschetti, S., and Mantegazza, M. (2013). Hippocampal hyperexcitability and specific epileptiform activity in a mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia* *54*, 1251–1261.
- Löscher, W., and Schmidt, D. (2011). Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia* *52*, 657–678.
- Löscher, W., and Schmidt, D. (2012). Epilepsy: perampanel-new promise for refractory epilepsy? *Nat. Rev. Neurol.* *8*, 661–662.
- Malhotra, J.D., Chen, C., Rivolta, I., Abriel, H., Malhotra, R., Mattei, L.N., Brosius, F.C., Kass, R.S., and Isom, L.L. (2001). Characterization of Sodium Channel α - and β -Subunits in Rat and Mouse Cardiac Myocytes. *Circulation* *103*, 1303–1310.
- Mantegazza, M., Gambardella, A., Rusconi, R., Schiavon, E., Annesi, F., Cassulini, R.R., Labate, A., Carrideo, S., Chifari, R., Canevini, M.P., et al. (2005). Identification of an Nav1.1 sodium channel (SCN1A) loss-of-function mutation associated with familial simple febrile seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18177–18182.
- Mantegazza, M., Rusconi, R., Scalmani, P., Avanzini, G., and Franceschetti, S. (2010a). Epileptogenic ion channel mutations: From bedside to bench and, hopefully, back again. *Epilepsy Res.* *92*, 1–29.
- Mantegazza, M., Curia, G., Biagini, G., Ragsdale, D.S., and Avoli, M. (2010b). Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* *9*, 413–424.
- Marban, E., Yamagishi, T., and Tomaselli, G.F. (1998). Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J. Physiol.* *508*, 647–657.
- Martin, M.S., Dutt, K., Papale, L.A., Dubé, C.M., Dutton, S.B., Haan, G. de, Shankar, A., Tufik, S., Meisler, M.H., Baram, T.Z., et al. (2010). Altered Function of the SCN1A Voltage-gated Sodium Channel Leads to γ -Aminobutyric Acid-ergic (GABAergic) Interneuron Abnormalities. *J. Biol. Chem.* *285*, 9823–9834.
- Mashimo, T., Ohmori, I., Ouchida, M., Ohno, Y., Tsurumi, T., Miki, T., Wakamori, M., Ishihara, S., Yoshida, T., Takizawa, A., et al. (2010). A Missense Mutation of the Gene Encoding Voltage-Dependent Sodium Channel (Nav1.1) Confers Susceptibility to Febrile Seizures in Rats. *J. Neurosci.* *30*, 5744–5753.
- Meisler, M.H., and Kearney, J.A. (2005). Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J. Clin. Invest.* *115*, 2010–2017.
- Miller, A.R., Hawkins, N.A., McCollom, C.E., and Kearney, J.A. (2014). Mapping genetic modifiers of survival in a mouse model of Dravet syndrome. *Genes Brain Behav.* *13*, 163–172.
- Miller, K.K., Hoffer, A., Svoboda, K.R., and Lupica, C.R. (1997). Cholecystokinin Increases GABA Release by Inhibiting a Resting K⁺ Conductance in Hippocampal Interneurons. *J. Neurosci.* *17*, 4994–5003.

- Millichap, J.J., Koh, S., Laux, L.C., and Nordli, D.R. (2009). Child Neurology: Dravet syndrome. *Neurology* 73, e59–e62.
- Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Petrou, S., Dibbens, L.M., Berkovic, S.F., and Harkin, L.A. (2005). SCN1A mutations and epilepsy. *Hum. Mutat.* 25, 535–542.
- Murlidharan, G., Samulski, R.J., and Asokan, A. (2014). Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Front. Mol. Neurosci.* 7.
- Naritoku, D.K., Casebeer, D.J., and Darbin, O. (2003). Effects of Seizure Repetition on Postictal and Interictal Neurocardiac Regulation in the Rat. *Epilepsia* 44, 912–916.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., et al. (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121–127.
- Noh, G.J., Asher, Y.J.T., and Graham, J.M. (2012). Clinical review of genetic epileptic encephalopathies. *Eur. J. Med. Genet.* 55, 281–298.
- Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., Inoue, I., Takeuchi, T., Itohara, S., Yanagawa, Y., Obata, K., et al. (2007). Nav1.1 Localizes to Axons of Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons: A Circuit Basis for Epileptic Seizures in Mice Carrying an Scn1a Gene Mutation. *J. Neurosci.* 27, 5903–5914.
- Packer, A.M., Roska, B., and Häusser, M. (2013). Targeting neurons and photons for optogenetics. *Nat. Neurosci.* 16, 805–815.
- Pal, D.K., Pong, A.W., and Chung, W.K. (2010). Genetic evaluation and counseling for epilepsy. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 445–453.
- Parr-Brownlie, L.C., Bosch-Bouju, C., Schoderboeck, L., Sizemore, R.J., Abraham, W.C., and Hughes, S.M. (2015). Lentiviral vectors as tools to understand central nervous system biology in mammalian model organisms. *Front. Mol. Neurosci.* 8.
- Pitkänen, A., Schwartzkroin, P.A., and Moshé, S.L. (2005). *Models of Seizures and Epilepsy* (Academic Press).
- Ragsdale, D.S. (2008). How do mutant Nav1.1 sodium channels cause epilepsy? *Brain Res. Rev.* 58, 149–159.
- Reynolds, E.H., and Kinnier Wilson, J.V. (2008). Psychoses of epilepsy in Babylon: The oldest account of the disorder. *Epilepsia* 49, 1488–1490.
- Rhodes, T.H., Vanoye, C.G., Ohmori, I., Ogiwara, I., Yamakawa, K., and George, A.L. (2005). Sodium channel dysfunction in intractable childhood epilepsy with generalized tonic–clonic seizures. *J. Physiol.* 569, 433–445.

Scheffer, I.E., and Berkovic, S.F. (1997). Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain J. Neurol.* 120 (Pt 3), 479–490.

Schmidt, M., Voutetakis, A., Afione, S., Zheng, C., Mandikian, D., and Chiorini, J.A. (2008). Adeno-Associated Virus Type 12 (AAV12): a Novel AAV Serotype with Sialic Acid- and Heparan Sulfate Proteoglycan-Independent Transduction Activity. *J. Virol.* 82, 1399–1406.

Serikawa, T., Mashimo, T., Kuramoto, T., Voigt, B., Ohno, Y., and Sasa, M. (2015). Advances on genetic rat models of epilepsy. *Exp. Anim.* 64, 1–7.

Shi, X.-Y., Tomonoh, Y., Wang, W.-Z., Ishii, A., Higurashi, N., Kurahashi, H., Kaneko, S., and Hirose, S. (2016). Original article: Efficacy of antiepileptic drugs for the treatment of Dravet syndrome with different genotypes. *Brain Dev.* 38, 40–46.

Singh, R., Andermann, E., Whitehouse, W.P.A., Harvey, A.S., Keene, D.L., Seni, M.-H., Crossland, K.M., Andermann, F., Berkovic, S.F., and Scheffer, I.E. (2001). Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy: Extended Spectrum of GEFS+? *Epilepsia* 42, 837–844.

Slais, K., Vorisek, I., Zoremba, N., Homola, A., Dmytrenko, L., and Sykova, E. (2008). Brain metabolism and diffusion in the rat cerebral cortex during pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp. Neurol.* 209, 145–154.

Snoeijen-Schouwenaars, F. m., Veendrick, M. j. b. m., van Mierlo, P., van Erp, G., de Louw, A. j. a., Kleine, B. u., Schelhaas, H. j., and Tan, I. y. (2015). Carbamazepine and oxcarbazepine in adult patients with Dravet syndrome: Friend or foe? *Seizure Eur. J. Epilepsy* 29, 114–118.

Stasi, A.M.D., Farisello, P., Marcon, I., Cavallari, S., Forli, A., Vecchia, D., Losi, G., Mantegazza, M., Panzeri, S., Carmignoto, G., et al. (2016). Unaltered Network Activity and Interneuronal Firing During Spontaneous Cortical Dynamics In Vivo in a Mouse Model of Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Cereb. Cortex* bhw002.

Steinlein, O.K. (2001). Genes and mutations in idiopathic epilepsy. *Am. J. Med. Genet.* 106, 139–145.

Steinlein, O.K. (2002). Channelopathies can cause epilepsy in man. *Eur. J. Pain* 6, 27–34.

Stringer, J.L., and Sowell, K.L. (1994). Kainic acid, bicuculline, pentylentetrazol and pilocarpine elicit maximal dentate activation in the anesthetized rat. *Epilepsy Res.* 18, 11–21.

Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., and Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339, 597–603.

Tafakhori, A., Aghamollai, V., Faghihi-Kashani, S., Sarraf, P., and Habibi, L. (2015). Epileptic syndromes: From clinic to genetic. *Iran. J. Neurol.* 14, 1–7.

- Tang, B., Dutt, K., Papale, L., Rusconi, R., Shankar, A., Hunter, J., Tufik, S., Yu, F.H., Catterall, W.A., Mantegazza, M., et al. (2009). A BAC transgenic mouse model reveals neuron subtype-specific effects of a Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus (GEFS+) mutation. *Neurobiol. Dis.* *35*, 91–102.
- Thomas, R.H., and Berkovic, S.F. (2014). The hidden genetics of epilepsy—a clinically important new paradigm. *Nat. Rev. Neurol.* *10*, 283–292.
- Traynelis, S.F., and Dingledine, R. (1988). Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J. Neurophysiol.* *59*, 259–276.
- Tudor, M., Tudor, L., and Tudor, K.I. (2005). [Hans Berger (1873-1941)--the history of electroencephalography]. *Acta Medica Croat. Časopis Hrvatske Akad. Med. Znan.* *59*, 307–313.
- Vacher, H., Mohapatra, D.P., and Trimmer, J.S. (2008). Localization and Targeting of Voltage-Gated Ion Channels in Mammalian Central Neurons. *Physiol. Rev.* *88*, 1407–1447.
- Van Wart, A., Trimmer, J.S., and Matthews, G. (2007). Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J. Comp. Neurol.* *500*, 339–352.
- Velíšková, J., Velíšek, L., Mareš, P., Rokyta, R., and Budko, K.P. (1991). Bicuculline-induced neocortical epileptiform foci and the effects of 6-hydroxydopamine in developing rats. *Brain Res. Bull.* *26*, 693–698.
- Westenbroek, R.E., Merrick, D.K., and Catterall, W.A. (1989). Differential subcellular localization of the RI and RII Na⁺ channel subtypes in central neurons. *Neuron* *3*, 695–704.
- Wirrell, E.C. (2016). Treatment of Dravet Syndrome. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* *43 Suppl 3*, S13–S18.
- Xu, X., Zhang, Y., Sun, H., Liu, X., Yang, X., Xiong, H., Jiang, Y., Bao, X., Wang, S., Yang, Z., et al. (2014). Early clinical features and diagnosis of Dravet syndrome in 138 Chinese patients with SCN1A mutations. *Brain Dev.* *36*, 676–681.
- Yang, N., George Jr., A.L., and Horn, R. (1996). Molecular Basis of Charge Movement in Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* *16*, 113–122.
- Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1991). Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* *251*, 939–942.
- Yu, F.H., Mantegazza, M., Westenbroek, R.E., Robbins, C.A., Kalume, F., Burton, K.A., Spain, W.J., McKnight, G.S., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat. Neurosci.* *9*, 1142–1149.

Zhang, F., Gradinaru, V., Adamantidis, A.R., Durand, R., Airan, R.D., de Lecea, L., and Deisseroth, K. (2010). Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat. Protoc.* *5*, 439–456.

Zijlmans, M., Jiruska, P., Zelman, R., Leijten, F.S.S., Jefferys, J.G.R., and Gotman, J. (2012). High-Frequency Oscillations as a New Biomarker in Epilepsy. *Ann. Neurol.* *71*, 169–178.

Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Mol. Ther.* *16*, 1073–1080.

