



HAL
open science

**Dépression Corticale Envahissante : nouveau mécanisme
d'initiation par hyperactivité des neurones
GABAergiques, et stratégie pharmacologique pour la
réduire**

Sarah Zerimech

► **To cite this version:**

Sarah Zerimech. Dépression Corticale Envahissante : nouveau mécanisme d'initiation par hyperactivité des neurones GABAergiques, et stratégie pharmacologique pour la réduire. Biologie cellulaire. CO-MUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR4032 . tel-02617971

HAL Id: tel-02617971

<https://theses.hal.science/tel-02617971>

Submitted on 25 May 2020

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 DE DOCTORAT

Dépression Corticale Envahissante

Nouveau mécanisme d'initiation par hyperactivité des neurones GABAergiques, et stratégie pharmacologique pour la réduire

Sarah ZERIMECH

IPMC, CNRS, UMR 7275

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en SVS
d'Université Côte d'Azur
Dirigée par : Massimo MANTEGAZZA
Soutenue le : 16 Mai 2019**

Devant le jury, composé de :
Federica BERTASO, Dr, IGF Montpellier
Patrick DELMAS, Dr, CRN2M Marseille
Michèle STUDER, Dr, iBV Nice



DESIRE
Development & Epilepsy


 LABEX ICST
ION CHANNEL SCIENCE AND THERAPEUTICS 

Dépression Corticale Envahissante

Nouveau mécanisme d'initiation par hyperactivité des neurones GABAergiques, et stratégie pharmacologique pour la réduire

Jury :

Présidente du Jury

Michèle STUDER, Dr, iBV Nice

Rapporteur/trice

Federica BERTASO, Dr, IGF Montpellier

Patrick DELMAS, Dr, CRN2M Marseille

Résumé et mots clés

Dépression Corticale Envahissante : nouveau mécanisme d'initiation par hyperactivité des neurones GABAergiques et stratégie pharmacologique pour la réduire

La Dépression Corticale Envahissante (Cortical Spreading Depression) est une vague de dépolarisation neuronale qui se propage lentement à travers le cortex cérébral. Elle génère une phase rapide d'hyperactivité neuronale suivie d'une phase plus lente de silence électrique des cellules du cortex. Il est possible d'induire expérimentalement la DCE sur différents modèles animaux, in vivo ou sur tranches de néocortex, par application locale de Glutamate, d'Acétylcholine ou d'une solution hautement concentrée en potassium, ou par stimulation électrique.

La DCE est largement étudiée comme mécanisme physio-pathologique de la migraine avec aura, mais aussi de l'ischémie. Les études sur la DCE expérimentale ont montré l'implication de nombreuses substances biologiques dans la génération et la propagation de cette vague, comprenant le Potassium, le Calcium, le Glutamate et d'autres neurotransmetteurs. L'approche pharmacologique permet de placer d'acteurs dans ce phénomène électrique, les canaux dépendant du potentiel, les récepteurs ionotropes du glutamate (NMDA et AMPA-kainate), les astrocytes et les pompes et échangeurs Na-K.

Il existe une forme monogénique de Migraine avec Aura, la Migraine Hémiplégique Familiale, où la crise de migraine est associée à des troubles moteurs d'intensité variable, qui a permis d'identifier des mutations génétiques, donc des dysfonctions à niveau moléculaire. A ce jour trois types principaux, donc trois gènes mutés, de cette MHF sont décrits et étudiés. L'étude des modèles de souris de MHF 1 (mutation gain de fonction du Cav2.1) et de MHF 2 (mutation perte de fonction de Na-K-ATPase), confirme l'implication primordiale du Glutamate et du Potassium dans l'initiation de la DCE. Le type 3 de MHF est du à des mutations du Nav1.1, un canal sodique dépendant du potentiel, majoritairement exprimé dans les neurones GABAergiques où ils sont très importants pour leur excitabilité. Notre laboratoire a montré sur neurones transfectés en culture qu'il s'agissait d'une mutation gain de fonction, entraînant une augmentation de l'excitabilité des neurones. Cependant, le lien entre cette mutation, l'hyperexcitabilité corticale et la facilitation de la DCE – déjà observée dans les autres modèles de FHM – ou le phénotype de Migraine FHM reste inconnu.

Notre hypothèse de travail, et la base de mon sujet de thèse, est que l'augmentation de l'activité des canaux Nav1.1 ou des neurones GABAergiques, déclencherait une hyperexcitabilité corticale et une DCE. Pour éprouver cette hypothèse, mes travaux de thèse ont nécessité une approche expérimentale ex vivo, sur tranches de néocortex de souris sauvages et transgéniques, associée à de l'électrophysiologie extracellulaire, imagerie IOS, pharmacologie et/ou optogénétique. L'activation des canaux Nav1.1 par une toxine

activatrice sélective, ou la stimulation optogénétique des neurones GABAergiques, est capable d'induire une DCE, confirmant notre hypothèse initiale et ajoutant un nouveau modèle d'induction. Mes travaux de thèse ont permis d'identifier et de caractériser ce nouveau modèle de DCE où l'hyperexcitabilité des neurones GABAergiques conduit à une accumulation initiale de potassium dans le milieu extracellulaire, qui dépolarise et active de plus en plus de neurones excitateurs Glutamatergiques. Ceci entraîne une libération soutenue de potassium jusqu'à atteindre un seuil critique pour le déclenchement de la DCE.

Dans un second temps, mes travaux de thèse se sont orientés vers une modulation pharmacologique de l'activité de réseau, avec pour objectif de trouver un nouvel élément permettant de diminuer la susceptibilité à la DCE. Pour cela, par la même approche expérimentale, j'ai utilisé un agent cholinergique, le Carbachol, connu et utilisé pour moduler l'activité de réseau. Les résultats obtenus montrent que même si le Carbachol augmente l'excitabilité de réseau, il rend plus difficile l'induction d'une DCE, et agirait par l'intermédiaire de la voie cholinergique muscarinique.

En conclusion, durant ma thèse j'ai pu mettre en évidence un nouveau mécanisme d'induction de la DCE, et une nouvelle voie d'inhibition de la DCE par modulation cholinergique.

Mots clés : Nav1.1, neurones GABAergiques, DCE, excitabilité, aura, migraine

Cortical Spreading Depression: a new mechanism of induction by GABAergic neurons hyperactivity, and pharmacological strategy to reduce it

Cortical Spreading Depression is a wave of neuronal depolarization that spread slowly across cerebral cortex. It generates a rapid phase of neuronal hyperactivity, followed by a slower phase of electrical silence of cortical cells. It is possible to experimentally induce CSD on several animal models, in vivo or on neocortical slices, by focal application of Glutamate, Acetylcholine or highly concentrated KCl solution, or by electrical stimulation.

CSD is widely studied as the pathophysiological mechanism of migraine with aura, but also ischemia. Studies of experimental CSD have shown involvement of numerous biological substances in the wave generation and propagation, including Potassium, Calcium, Glutamate, and other neurotransmitters. The pharmacological approach allows to identify actors of this electrical phenomenon: voltage gated channel, ionotropic glutamate receptors (NMDA & AMPA-kainate), astrocytes and Na-K pumps.

Familial Hemiplegic Migraine is a monogenic form of migraine with aura; the migraine attack is associated with variable motor disorders. Genetic mutations have been described leading to molecular dysfunctions. Nowadays three main forms of this pathology caused by three

mutated genes, have been described and studied. FHM type 1 (Cav2.1 gain of function) and FHM type 2 (NaK ATPase pump loss of function) mouse models studies confirmed the important involvement of Glutamate and Potassium in CSD initiation.

Type 3 of FHM is caused by Nav1.1 mutations, a voltage gated sodium channel that is widely expressed in GABAergic neurons in which they are essential for excitability. Our team showed on transfected neurons in culture that the mutation is a gain of function, leading to an increased neuronal excitability. However, the link between the mutation, cortical hyperexcitability and CSD facilitation or FHM phenotype, remains unknown.

Our work hypothesis and the base of my research project, is that the increasing Nav1.1 channel or GABAergic neurons' activity, triggers a cortical hyperexcitability and CSD. To confirm this hypothesis, my work required an ex vivo experimental approach, on acute neocortical slices of wild-type and transgenic mice, associated with extracellular electrophysiology, IOS imaging, pharmacology and/or optogenetics. Nav1.1 channel activation by a selective activator (spider toxin), or GABAergic neurons stimulation by optogenetics, can trigger CSD, validating our initial hypothesis and identify a new model of CSD.

My work allows us to highlight and characterize a new model of CSD by GABAergic neuron hyperexcitability leading to an initial build up of extracellular potassium, that depolarizes and activates more and more excitatory neurons. This leads to a sustained potassium release until a critical threshold of CSD triggering.

In a second time, my thesis work explored a pharmacologic modulation of network excitability, to find new elements that could decrease the CSD susceptibility. To do so, with the same experimental approach, I used a cholinergic agonist, Carbachol, known for modulation of the network activity. The results showed that even if Carbachol increases network excitability, it inhibits CSD induction, likely through the muscarinic pathway.

In conclusion, during my thesis I identified a new mechanism of CSD induction, and a new inhibitory pathway of CSD by cholinergic modulation.

Keywords: Nav1.1, GABAergic neurons, CSD, excitability, aura, migraine

*A mes grands-pères, et à mes aînés qui m'ont vue prendre ce chemin mais
partis trop tôt pour me voir le finir...*

« Mais vous savez assez bien à présent
que le commencement est une
revendication trop grande pour quiconque,
et que tout héros ne joue qu'un petit rôle
dans les grandes actions. »

J.R.R Tolkien

Remerciements

Je remercie les membres du jury, les Dr. Michèle STUDER (Présidente), Patrick DELMAS (Rapporteur) et Federica BERTASO (Rapporteuse), d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr. Massimo MANTEGAZZA, pour m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de continuer et d'explorer cet excitant projet de recherche. Sa patience, sa pédagogie, ses conseils et ses encouragements, m'ont permis de me plonger sereinement dans cette thèse, d'avancer et d'évoluer.

Cette thèse n'aurait pas été cette aventure épique sans le Dr. Oana CHEVER. C'est une chance incroyable d'avoir pour collègue et principale collaboratrice, sa tutrice de stage de master qui a su si bien me cerner et me donner les bases pour commencer cette thèse dans les meilleures conditions.

Merci à Marion AYRAULT, Fanny NAZARET, Estelle MAZELLA et Emilie BONNET, pour leur aide et participation si précieuses, et avec qui il a été agréable et enrichissant de travailler.

Merci à Sandrine que j'ai trop souvent inquiétée, qui met toujours un point d'honneur à nous couvrir et s'assurer que tout va bien. Merci à Fabrice et Alexandre, et aussi à Paolo de l'autre côté de la frontière, pour leur aide dans ce projet. Merci à Isabelle, Sandra, Fabrizio, et Lara, des collègues en or !

Merci à mes camarades de salle... Sokchea, merci pour ta bonne humeur, nos discussions à bâtons rompus, la transformation de la salle en discothèque coréenne. Sophie, merci pour tes encouragements et tes petits mots qui redonnent la pêche.

Merci à tous les résidents, de passage ou de longue durée, de l'étage mais aussi de tout l'institut avec qui j'ai pu échanger, une conversation, une recette, une marque de thé, une séance de sport...

La famille tient une place importante dans mon cœur, aussi j'adresse mille mercis à mes parents, mes premiers supporteurs mais aussi mes modèles. Votre patience est sans égale, et votre soutien indéfectible. Merci à ma petite famille de « Saint-Bonnet » qui n'a eu de cesse de m'envoyer leurs soutiens et vœux de réussite toutes ces années ; j'espère que vous serez présents le jour J !

Et grand merci à tous les membres de la *Broc Army* avec qui j'ai pu interagir, une source constante de bonne humeur et de rires, et qui ont su bravement supporter mes accès de folie. *On est Vikings ou on l'est pas ?!*

Abréviations

5HT3aR : Récepteur 5-Hydroxytryptamine 3A, activé par la sérotonine

Aa : acide aminé

Ach : Acétylcholine/Acetylcholin

ACSF : Artificial cerebrospinal fluid

ADNc : Acide désoxyribonucléique codant

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ATP : adénosine triphosphate

Cav : Canal Calcique dépendant du potentiel

CGRP : Calcitonin gene-related peptide

ChR2 : ChannelRhodopsine 2

CSD : Cortical Spreading Depression

DCE : Dépression Corticale Envahissante

DRG : Dorsal Root Ganglion

EEG : Electroencéphalogramme

FHM : Familial Hemiplegic Migraine

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GEFS+ : Generalized epilepsy with febrile seizures plus

HEK : Human embryonic kidney 293 cells

Hz : Hertz

IP3 : Inositol trisphosphate

IRMf : imagerie par résonance magnétique fonctionnelle

IOS : Intrinsic Optic Signal

KDa : Kilo Dalton

KI : Knock-In

KO : Knock-Out

Kv : Canal potassique dépendant du potentiel

LCR : Liquide Céphalo Rachidien

LFP : Local Field Potential / Potentiel de Champ

MA : Migraine avec Aura

mAChR : Récepteurs ACh muscariniques

MHF : Migraine Hémiplégique Familiale

mm : millimètre

mM : milli Molaire

mV : millivolt

Nav : Canal sodique dépendant du potentiel

nM : nano Molaire

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NT : Neurotransmetteur

PA : Potentiel d'Action

pb : paire de base

PCR : polymerase chain reaction

PPS : Potentiel Post Synaptique
PPSE : Potentiel Post Synaptique Excitateur
PV : Parvalbumine
REM : Rapid Eye Movement
SD : Syndrome de Dravet
SEM : Standard error of the mean
SMEI : Severe myoclonic epilepsy of infancy
SNC : Système Nerveux Central
SST : Somatostatine
STX : Saxitoxin
TREK : TWIK-related K⁺ channel
TRESK : TWIK-related spinal cord potassium channel
TTX : Tétrodotoxine
VGAT : vesicular GABA transporter
WT : Wild Type

*** Sommaire ***

INTRODUCTION	12
RESEAU CORTICAL ET EXCITABILITE	13
<i>Couches corticales</i>	13
<i>Neurones</i>	15
<i>Neurones GABAergiques</i>	17
<i>Cellules Gliales</i>	18
<i>Potentiel de Repos</i>	19
<i>Potentiel d'Action</i>	21
<i>Canaux Ioniques dans l'excitabilité neuronale</i>	23
MIGRAINE	30
<i>Historique</i>	30
<i>Migraines</i>	31
<i>Céphalée Migraineuse</i>	32
<i>Migraine Hémiplégique</i>	34
<i>Migraine avec Aura et Mutation TRESK</i>	39
<i>Migraine et Hyperactivité Corticale</i>	39
DEPRESSION CORTICALE ENVAHISSANTE	41
<i>Découverte de la DCE par A.A.P. Leão</i>	41
<i>Description de la DCE</i>	43
<i>DCE expérimentale</i>	45
<i>Rôle des Astrocytes</i>	46
<i>DCE et Migraine</i>	46
<i>DCE et Aura</i>	47
<i>DCE et Voie Trigéminal</i> e.....	48
INTRODUCTION DU PROJET DE RECHERCHE	50
1. ROLE DE L'ACTIVATION DU NAV1.1 ET DES NEURONES GABAERGIQUES DANS L'INDUCTION DE LA DCE	51
<i>Les mutations pathogènes du gène SCN1A</i>	52
<i>Effets fonctionnels sur les propriétés d'excitabilité du canal et des neurones, étudiées dans les systèmes d'expression</i>	53
<i>Mutations Epileptogènes</i>	54

<i>Mutation MHF 3</i>	56
<i>Approche Expérimentale</i>	58
2. MODULATION MUSCARINIQUE DE LA DEPRESSION CORTICALE ENVAHISSANTE	65
3. EFFET DE L'INVALIDATION DES CANAUX TRESK SUR L'INDUCTION DE LA DCE.....	71
MATERIEL ET METHODES.....	73
MODELE ANIMAL	74
<i>Ethique et Législation</i>	74
<i>Lignées Optogénétiques</i>	74
<i>Géotypage</i>	76
ENREGISTREMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES.....	89
<i>Préparation des tranches de cerveau pour enregistrements électrophysiologiques ex vivo</i>	89
<i>Induction de la Dépression Corticale Envahissante ex vivo</i>	89
<i>Enregistrements électrophysiologiques ex vivo – Potentiel de Champ sur tranches</i>	91
<i>Enregistrements électrophysiologiques ex vivo – Whole cell Patch-clamp sur tranches</i>	92
<i>Pharmacologie</i>	92
<i>Analyses Statistiques</i>	93
RESULTATS	94
PARTIE 1 – ROLE DE L'ACTIVATION DU $Na_v1.1$ ET DES NEURONES GABAERGIQUES DANS L'INDUCTION DE LA DCE	95
PARTIE 2 – MODULATION MUSCARINIQUE DE LA DEPRESSION CORTICALE ENVAHISSANTE	148
PARTIE 3 – EFFET DE L'INVALIDATION DES CANAUX TRESK SUR L'INDUCTION DE LA DCE.....	170
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	180

INTRODUCTION

RESEAU CORTICAL ET EXCITABILITE

Chez l'humain comme le reste du règne animal, le système nerveux est composé de différents types cellulaires : les neurones et les cellules gliales, organisés en un réseau de communication extrêmement complexe.

Le cortex cérébral des mammifères est une structure hautement organisée et complexe, constituée de six couches corticales, et qui contient plusieurs centaines de types cellulaires de neurones différents et un large panel de cellules gliales. C'est la région du cerveau qui est responsable des fonctions cognitives, de la perception sensorielle et de la conscience. Il y a deux larges classes de neurones corticaux : les interneurones qui font des connexions locales et les neurones de projection, qui étendent leurs axones vers des cibles intra corticales, sous corticales mais aussi sous cérébrales.

Les neurones de projection sont des neurones Glutamatergiques caractérisés par une morphologie typiquement pyramidale, qui transmet l'information entre différentes régions du néocortex et vers d'autres régions du cerveau. Pendant le développement, ils sont générés à partir des progéniteurs de la zone germinale néocorticale localisée dans le mur dorsolatéral du télencéphale.

En revanche, les interneurones libérant le GABA et les cellules Horizontales de Cajal, sont générés principalement par des progéniteurs respectivement dans le télencéphale ventral et le bord cortical, et migrent sur de longues distances vers leur localisation finale dans le néocortex.

Dans le néocortex mature, des populations distinctes de neurones de projection sont localisées dans différentes couches et régions corticales. Elles ont des caractéristiques morphologiques uniques, expriment différents facteurs de transcription, et servent à différentes fonctions.

La complexité et la diversité des sous-types de neurones de projection rendent tout schéma de classification difficile, mais le système de classification le plus précis prend en compte la morphologie, les propriétés électrophysiologiques et les motifs d'expression des gènes.

Couches corticales

Les six couches corticales du néocortex contiennent chacune une distribution caractéristique des différents neurones et de leurs connexions avec d'autres régions corticales et sous-

corticales (figure 1). Un des exemples les plus clairs de la distribution des couches corticales est la Ligne de Gennari dans le cortex visuel primaire. C'est une bande de substance blanche qui peut être observée à l'œil nu dans le lobe occipital. La Ligne de Gennari est composée d'axones amenant l'information visuelle depuis le Thalamus vers la couche IV du cortex visuel.

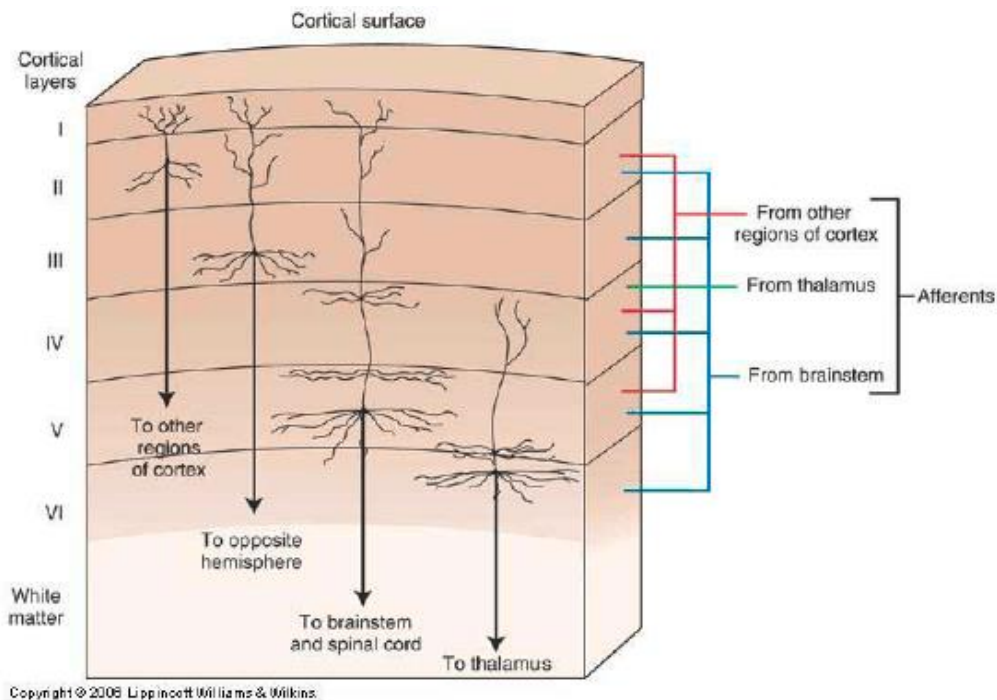


Figure 1 Schéma des couches corticales cérébrales ; le cortex se compose de six couches présentant une distribution caractéristique des sous types neuronaux et de leurs connexions intra corticales et sous corticales.

La **couche I** est la Couche Moléculaire, elle contient quelques neurones éparpillés. La couche I comprend largement des extensions de dendrites apicales des neurones pyramidaux et des axones horizontaux, des cellules horizontales de Cajal (cellules de Cajal-Retzius) ainsi que des cellules gliales.

La **couche II** est la couche granulaire externe, qui contient de nombreux petits neurones pyramidaux et neurones stellaires ;

La **couche III**, la couche pyramidale externe, contient principalement des neurones pyramidaux de petite et moyenne taille, ainsi que des neurones non pyramidaux dont les axones sont orientés verticalement dans le cortex. Si la couche I est la principale cible des Afférences cortico-corticales inter hémisphériques, la couche III est la principale source d'Efférences cortico-corticales.

La **couche IV** granulaire interne, contient différents types de neurones stellaires et pyramidaux, et elle est la principale cible des Afférences Thalamo-Corticales venant des neurones thalamiques Type C ainsi que des Afférences cortico-corticales intra-hémisphériques. Les couches supérieures sont nommées couches supragranulaires (I à III), tandis que les couches inférieures sont nommées couches Infragranulaires (V et VI).

La **couche V**, pyramidale interne, contient des neurones pyramidaux larges. Les axones de ces neurones quittent le cortex et se connectent aux structures sous corticales dont les Ganglions de la Base. Dans le cortex moteur primaire du lobe frontal, la couche V contient des cellules pyramidales géantes, nommées Cellules de Betz, dont les axones voyagent à travers la capsule interne, le tronc cérébral, et la moelle épinière, constituant ainsi le Tractus CorticoSpinal, qui est la principale voie du contrôle volontaire du mouvement.

La **couche VI**, ou couche polymorphe, contient peu de larges neurones pyramidaux, beaucoup de petit neurones pyramidaux et des neurones multifformes. La couche VI envoie des fibres Efférentes dans le Thalamus, établissant une interconnexion spécifique et très précise entre le cortex et le thalamus. Ces connexions sont à la fois excitatrices et inhibitrices. Les neurones envoient les fibres excitatrices aux neurones du Thalamus et envoient aussi des collatérales au noyau réticulaire du Thalamus qui inhibent les mêmes neurones thalamiques ou ceux qui leurs sont adjacents.

Neurones

Les **Neurones** sont des cellules excitables hautement différenciées et essentielles au tissu nerveux. Ils génèrent un signal électrique en réponse à un stimulus et qui va se propager le long de leur membrane, c'est le **Potentiel d'Action** (ou influx nerveux). Les neurones sont composés de trois éléments structuraux (figure 2) :

- Un **soma** ou corps cellulaire, qui contient le noyau, le cytoplasme et des organites cellulaires (mitochondrie, appareil de golgi, réticulum...) et d'où émergent deux types de prolongements :
- Un **axone**, lisse et long, qui constitue la partie émettrice du neurone et forme à son bout une terminaison synaptique, et
- Des **dendrites**, prolongements courts, ramifiés et fins ; certains neurones présentent en plus des structures appelées épines dendritiques, formant la partie réceptrice.

Ces cellules forment des **synapses** avec d'autres neurones. Il s'agit d'une zone de communication avec, en amont un élément pré-synaptique formé par l'axone, en aval un élément post-synaptique formé par les épines dendritiques, et une fente synaptique entre les deux éléments. Les terminaisons axonales pré-synaptiques possèdent dans le cytosol des vésicules synaptiques qui contiennent des neurotransmetteurs. Ces molécules sont destinées à être libérées dans la fente pour agir sur le neurone post-synaptique.

On peut différencier les neurones de plusieurs manières : en considérant leur taille, leur morphologie, leur localisation dans le système nerveux, ou encore par la nature des neurotransmetteurs libérés. On distingue alors trois principaux types de neurones **excitateurs**, **inhibiteurs** et **modulateurs** libérant respectivement des neurotransmetteurs à effet excitateur (glutamate, aspartate), inhibiteur (GABA, glycine) et modulateur (acétylcholine, dopamine, sérotonine).

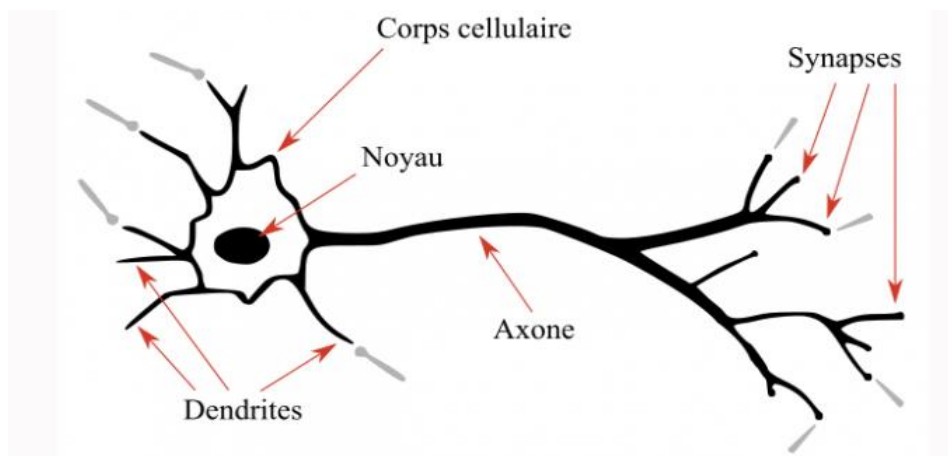


Figure 2 Schéma d'un neurone et de ses structures ; un neurone se compose d'un soma (corps cellulaire), d'un axone qui forme la partie émettrice du neurone et de dendrites qui forment la partie réceptrice. Les synapses sont des zones de communication entre les neurones, constituées d'un élément pré-synaptique (axone) et d'un élément post-synaptique (dendrite).

La communication neuronale se fait à deux niveaux, par influx nerveux et par libération de neurotransmetteur, où le Potentiel d'Action va entraîner *in fine* la libération de neurotransmetteurs pour conduire chimiquement le signal au neurone post-synaptique. Cette communication est, de plus, finement régulée par les actions mutuelles excitatrices et inhibitrices que les neurones exercent entre eux.

Dans le cerveau, la distinction entre les types de neurones est très complexe. D'un point de vue anatomique, dans le SNC il est possible de décrire trois grands types de neurones. Les neurones **Unipolaires** ne possèdent qu'un processus protoplasmique qui s'étend depuis le corps cellulaire. Les neurones **Bipolaires**, possèdent deux extensions, l'une est l'axone,

l'autre une dendrite. La plupart des neurones sont **Multipolaires**, ils possèdent un axone et plusieurs dendrites permettant l'intégration d'une quantité importante d'informations venant d'autres neurones ; les neurones dits **pyramidaux** sont des neurones multipolaires.

Neurones GABAergiques

Le subpallium embryonnaire génère tous les neurones GABAergiques dans le télencéphalon. Les interneurones GABAergiques sont distribués à travers l'amygdale, le striatum et le cortex cérébral. Un réseau régulateur de gènes codant pour les facteurs de transcription Dlx1, Dlx2, Ascl1, Gsx1, et Gsx2, est requis pour la spécialisation de tous les neurones GABAergiques dans le subpallium. L'émergence de la diversité neuronale, est liée à la spécialisation temporelle et spatiale des cellules progénitrices par des réseaux additionnels de facteurs de transcription, qui restreignent le potentiel de ces cellules à générer seulement certaines classes de neurones GABAergiques.

D'un point de vue morphologique, neurochimique et électrophysiologique, plus de 20 types différents de neurones inhibiteurs ont été décrits dans le néocortex et l'hippocampe. Les interneurones corticaux peuvent être organisés en classes majeurs sur la base de leurs similarités transcriptionnelles et l'expression de marqueurs sélectifs, et certaines de ces classes peuvent aussi être divisées en sous classes contenant des types similaires d'interneurones. La figure 3 présente les différents sous types de neurones GABAergiques, ainsi que leurs distributions des couches corticales.

La plus grande classe d'interneurones corticaux est caractérisée par l'expression de la **Parvalbumine**. Trois classes majeures d'interneurones PV+ peuvent être distinguées, toutes présentent des propriétés caractéristiques de décharges rapides (« fast-spiking » firing) : cellules en chandelier (chandelier cells), cellules en corbeille (basket cells), et interneurones translaminaires.

Une seconde classe d'interneurones est caractérisée par l'expression du **neuropeptide Somatostatine** (SST) et le ciblage dendritique préférentiel de leurs synapses. Il y a deux types majeurs d'interneurones SST+ : les cellules Martinotti et les cellules non-Martinotti. En plus des interneurones SST+, le néocortex contient des neurones GABAergiques à projections longues qui expriment la SST. Ces cellules sont les plus abondantes dans les couches profondes et projettent vers d'autres régions du néocortex.

Une troisième classe très hétérogène d'interneurones corticaux exprime le **récepteur à la sérotonine 5HT3aR**. Parmi eux, les interneurones qui expriment le peptide vasoactif

intestinal (VIP) sont les plus abondants. Ils sont principalement désinhibiteurs car ils ciblent préférentiellement les interneurones PV+ et SST+(1).

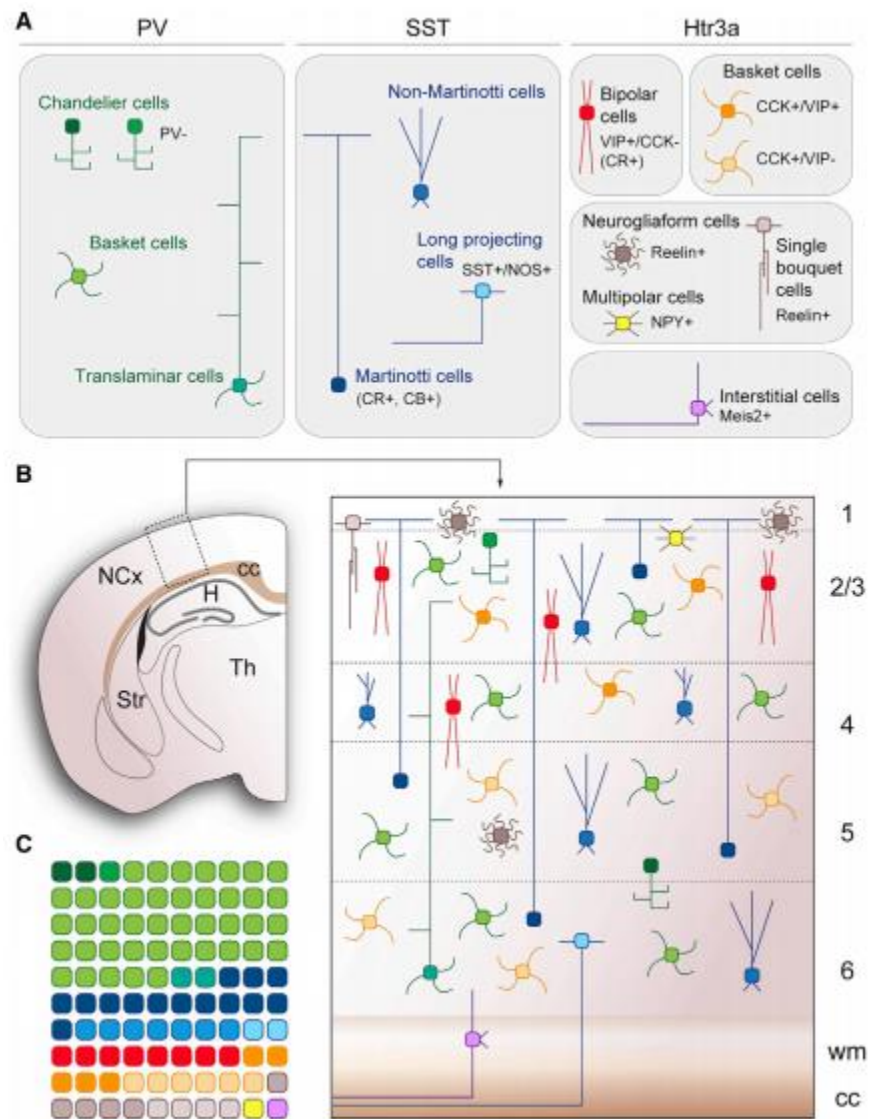


Figure 3 Description, localisation et distribution des différents types et sous types d'interneurones dans le Néocortex de souris ; en vert les neurones PV+, et en bleu les neurones SST+. En C un diagramme représente la proportion des types de neurones GABAergiques, les neurones PV+ sont majoritaires. (Lim et al, 2018)

Cellules Gliales

Les **cellules gliales**, ou (neuro)glie, sont des cellules non neuronales du système nerveux central et du système nerveux périphérique. Elles maintiennent l'homéostasie, forment la myéline, fournissent support et protection aux neurones. Dans le SNC, la glie comprend les oligodendrocytes, les astrocytes, les cellules épendymaires et la microglie. Elles ont 4 fonctions principales : entourer les neurones et les maintenir en place, apporter nutriments

et oxygène aux neurones, isoler les neurones les uns des autres, détruire les pathogènes et enlever les neurones morts. Elles jouent aussi un rôle dans la neurotransmission et les connexions synaptiques.

Les **astrocytes** sont les cellules de la macroglie les plus abondantes dans le système nerveux central. Ils possèdent de nombreuses projections qui lient les neurones à leur apport sanguin tout en formant la barrière hémato encéphalique. Ils régulent l'environnement chimique externe des neurones en retirant les ions potassium en excès, et en re-capturant les neurotransmetteurs libérés pendant la transmission synaptique. Les astrocytes peuvent réguler la vasoconstriction et vasodilatation en produisant des substances comme l'acide arachidonique, dont les métabolites sont vasoactifs (figure 4).

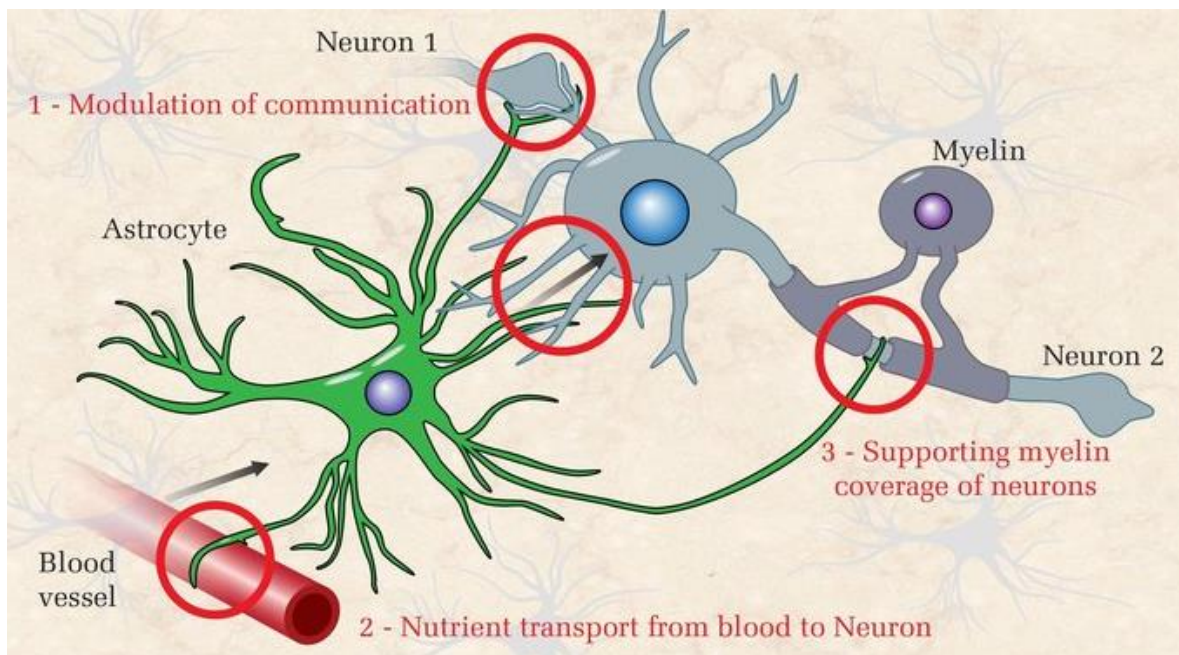


Figure 4 Rôles des Astrocytes dans le système nerveux central ; les trois principaux rôles sont la modulation de la communication, le transport de nutriment du sang vers les neurones, et le support de la myéline qui recouvre les neurones. (source : <https://www.wingsforlife.com/en/latest/astrocytes-the-star-cells-1637/>)

Les astrocytes utilisent l'ATP comme signal. Les jonctions gap (ou synapses électriques) entre les astrocytes permettent la molécule messenger IP3 de diffuser d'un astrocyte à un autre. L'IP3 active les canaux calciques sur les organites cellulaires, libérant le Ca^{2+} dans le cytoplasme.

Potentiel de Repos

La bicouche lipidique membranaire qui entoure le neurone est imperméable aux molécules chargées et aux ions. Pour entrer ou sortir du neurone, les ions doivent passer à travers des

protéines particulières, **canaux ioniques**, qui parcourent la membrane. Les canaux ioniques ont différentes configurations : ouvert, fermé et inactivé. Certains canaux ioniques doivent être activés afin de s'ouvrir et laisser passer les ions à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Ces canaux ioniques sont sensibles à l'environnement et peuvent changer leur forme en conséquence. Les canaux ioniques qui modifient leurs structures en réponse à des variations de potentiels sont appelés canaux ioniques dépendant du potentiel. Ces canaux régulent les concentrations des différents ions dans et hors de la cellule. La différence dans le total des charges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule est appelé le **Potentiel de membrane**. Les charges négatives sont principalement des ions chlore et phosphate, et les charges positives sont principalement des ions sodium.

Un neurone au repos est chargé négativement : chez les mammifères, l'intérieur de la cellule est à peu près 70 millivolts fois plus négatif que l'extérieur (**-70 mV**). Ce potentiel est appelé **Potentiel de Repos** ; il est dû à la différence dans les concentrations d'ions dans et hors de la cellule. Si la membrane était perméable de la même façon à tous les ions, chaque type d'ion passerait à travers la membrane et le système arriverait à un équilibre. Mais comme les ions ne peuvent pas traverser simplement la membrane, il y a des différences de concentrations pour plusieurs types d'ions (voir tableau). Le potentiel de repos est le résultat de différentes concentrations de Na^+ et K^+ à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule.

Ions	Concentration Extracellulaire (mM)	Concentration Intracellulaires (mM)
Na+	145	12
K+	3.5	155
Cl-	120	4

Tableau : concentrations intra et extracellulaires dans les neurones de mammifères.

Dans la membrane des neurones, des canaux perméables à certains ions et des pompes permettent des mouvements d'ions entre le milieu intra et extracellulaire. Naturellement, et sans obstacle, les ions diffusent dans le sens de leur **gradient de concentration**, c'est à dire depuis le compartiment où ils sont le plus concentrés au compartiment où ils le sont moins, afin de rétablir un équilibre de concentration entre les deux espaces. Ces flux entrant et sortant d'ions chargés provoquent des modifications dans le potentiel de la membrane, une différence de potentiel, en faveur d'une dépolarisation ou d'une hyperpolarisation. Ces mouvements peuvent être **actifs** et contre leur gradient de concentration (par des pompes), ou encore dans le sens du gradient **facilités** (à travers des canaux ioniques qui s'ouvrent en réponse à un stimulus) et **passifs** à travers des canaux de fuite.

Il existe donc des mouvements passifs d'ions à travers des **canaux de fuite**, comme c'est le cas du K^+ qui, suivant son gradient de concentration, tend à sortir du neurone, diminuant la quantité intracellulaire de cations, provoquant une hyperpolarisation de la membrane. De l'autre côté, le Na^+ peut diffuser à l'intérieur suivant son gradient de concentration, augmentant la quantité de cations, dépolarisant la membrane. Pour maintenir un potentiel de repos et une concentration physiologique des ions, des pompes ioniques du type Na K ATPase permettent la recapture de K^+ et l'extrusion du Na^+ , les forçant à aller à l'encontre leur gradient.

Les mouvements ioniques facilités se font à travers deux types de canaux ioniques : des **canaux ioniques dépendants du potentiel** de la membrane. Ils sont impliqués dans la génération et la propagation du potentiel d'action. Et des **canaux ioniques dépendants du ligand** qui eux sont activés par la fixation d'un ligand (neurotransmetteur, hormone...).

L'ouverture des canaux ioniques suite à un stimulus produit une variation du potentiel de membrane qui peut être dépolarisant ou hyperpolarisant. Lorsqu'ils sont générés en réponse à la fixation d'un neurotransmetteur, on parle de **Potentiel Post Synaptique**.

Potentiel d'Action

Le **potentiel d'action** (PA) se produit lorsque la dépolarisation locale de la membrane atteint un **seuil d'excitation**. Une fois déclenché, le PA se propage jusqu'à la terminaison synaptique axonale. Le PA se compose de deux phases principales : dépolarisation et hyperpolarisation.

La **dépolarisation** locale de la membrane entraîne l'ouverture des canaux sodiques et l'influx de Na^+ . Si la dépolarisation atteint le seuil, bien plus de canaux sodiques s'ouvrent et le potentiel de membrane du neurone atteint +30 mV, inversant sa polarité. Tant que la dépolarisation n'atteint pas le seuil, il n'y a pas de génération de PA (loi du « tout ou rien »).

La **repolarisation** (de +30 à -70 mV) survient lorsque, activés par la dépolarisation, les canaux potassiques dépendant du potentiel s'ouvrent et font sortir le K^+ , en même temps que les canaux Na^+ s'inactivent. La sortie de K^+ amène le potentiel de membrane à des valeurs négatives, repolarisant ainsi la membrane. Il peut y avoir par la suite une phase d'**hyperpolarisation tardive**, qui arrive si l'efflux de K^+ est suffisant pour faire redescendre le potentiel jusqu'à -90mV.

Lorsqu'il arrive au niveau de la synapse, le PA dépolarise la membrane de la terminaison pré synaptique, et des canaux calciques dépendant du potentiel s'ouvrent pour permettre un influx **d'ion Ca^{2+}** . La concentration de Ca^{2+} augmente dans le milieu intracellulaire, ce qui déclenche **l'exocytose** des **vésicules synaptiques** contenant les neurotransmetteurs qu'elles libéreront dans la fente synaptique.

Une fois dans la fente, les neurotransmetteurs se fixent à leurs **récepteurs post synaptiques**. Cette fixation permet l'activation et l'ouverture des récepteurs. Dans le cas d'un **récepteur canal ionique**, l'ouverture conduit à un efflux ou un influx d'ions, selon le gradient chimique de l'ion qui est considéré. Ce mouvement d'ions crée une **variation du potentiel de la membrane**, un **potentiel post synaptique** (PPS). Selon l'effet dépolarisant ou hyperpolarisant de l'activation du récepteur, on parlera de **PPS excitateur** ou **inhibiteur** respectivement. Dans le cas d'un neurotransmetteur excitateur, si le **PPSE atteint le seuil d'excitation, un PA est généré**. Après cela, les neurotransmetteurs sont éliminés de la fente synaptique soit par dégradation enzymatique, soit par recapture cellulaire pour qu'ils ne puissent pas activer trop longtemps leurs récepteurs.

On connaît à ce jour une centaine de neurotransmetteurs et neuromodulateurs. Ils sont synthétisés par les neurones et sont libérés par l'élément pré synaptique. Le glutamate, le GABA et l'acétylcholine sont les principaux neurotransmetteurs.

Le **glutamate** a un effet excitateur ; l'ouverture des récepteurs canaux ioniques au glutamate (NMDA, AMPA-Kaïnate), génèrent un courant dépolarisant. Si le glutamate n'est pas correctement recapturé hors de la fente, cela entraîne une **excitotoxicité**, c'est-à-dire une destruction des neurones à cause d'une activation prolongée et intense à cause du glutamate. Les transporteurs du glutamate, couplés fonctionnellement à des pompes ioniques, évitent cette excitotoxicité en recapturant le neurotransmetteur.

Le **GABA** est un neurotransmetteur inhibiteur ; sa fixation sur ses récepteurs canaux ioniques ($GABA_A$ $GABA_B$) entraîne une hyperpolarisation, une inhibition du neurone post synaptique. Son ouverture fait entrer du Cl^- , plus concentré à l'extérieur qu'à l'intérieur. Pour éviter une augmentation trop importante du Cl^- , inverser le gradient de concentration, et un courant dépolarisant (sortie du Cl^-), les transporteurs KCC2 extrudent le Cl^- dans le cerveau mature. Dans le cerveau immature, le Cl^- est plus concentré à l'intérieur, par l'action du transporteur NKCC1, ce qui fait que l'activation des récepteurs GABA provoque une dépolarisation, une activation des neurones.

L'excitabilité corticale peut être observée à travers des rythmes d'activités neuronales se traduisant en oscillations. Elles sont visibles à différents niveaux ; à l'échelle du neurone, le potentiel de membrane peut osciller et produire des motifs et des rythmes d'activités. La synchronisation d'un groupe de neurones interconnectés en réseau (visible expérimentalement en potentiel de champ) ou d'une région corticale (par EEG), produit des oscillations macroscopiques. Il en existe de différents types : delta (1 à 4 Hz), thêta (4 à 8 Hz), alpha (7,5 à 12,5 Hz), beta (13 à 30 Hz) et gamma (30 à 150 Hz).

Dans le cerveau physiologique, les oscillations sont impliquées dans un panel de fonctions, de la cognition à la motricité. Parmi les oscillations les plus étudiées, celles observées durant la phase de sommeil lent (non-REM sleep) ont la particularité de présenter une alternance d'état HAUT et BAS (UP/DOWN state) à un rythme lent compris entre 0,2 et 1 Hz, et où l'état HAUT est caractérisé par la présence rythmique d'activité synaptique et de décharges de potentiels d'action.

L'acétylcholine, neuromodulateur présent dans le système nerveux central comme dans le périphérique, est connu pour moduler les oscillations dans le néocortex et l'hippocampe, par l'activation de la voie muscarinique. *Lörincz et al* (2) montrent que ce type d'oscillations, précédemment enregistré chez le chat (3), est retrouvé chez la souris anesthésiée, généré au niveau de la couche V du néocortex et sous la dépendance de la voie muscarinique.

Canaux Ioniques dans l'excitabilité neuronale

Canaux Sodiques Dépendant du Potentiel – Nav

Comme décrit plus haut, la génération du PA se fait par l'influx d'ions Na^+ et ceci à travers des canaux ioniques que la dépolarisation membranaire active et ouvre.

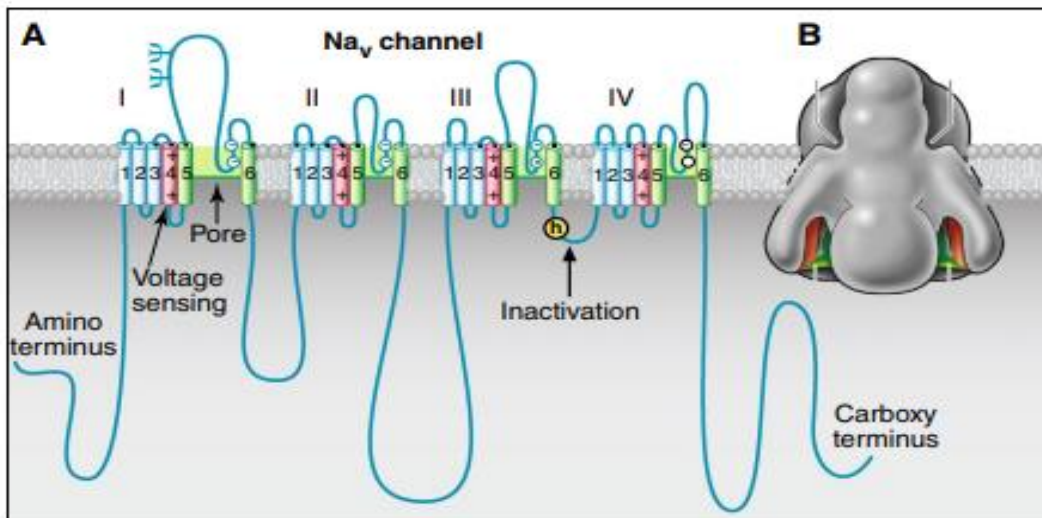
C'est en 1952 qu'Hodgkin et Huxley découvrent et posent le rôle du courant Nav à partir d'expériences sur l'axone de calmar.

Les canaux Nav sont composés d'un complexe de deux sous-unités : une sous-unité alpha de 260 kDa et une ou deux sous-unités beta plus petites de 30 à 40 kDa. (4, 5) Les canaux Nav dans le cerveau sont formés d'une sous unité alpha principale (Nav 1.1 à 1.9, codés par les gènes SCN1A à SCN11A), et sont constitués de quatre domaines faits chacun de six segments transmembranaires, associés à des sous unités auxiliaires beta (1 à 4, codé par les gens SCN1B à 4B) qui ont un seul domaine transmembranaire. Les sous-unités alpha forment le pore conducteur d'ion, il est pleinement fonctionnel en tant que canal Na^+ et il

est la cible des drogues anti épileptiques. Les sous unités beta modulent les propriétés fonctionnelles et peuvent être impliquées dans le ciblage sous cellulaire des sous unités alpha.

La sous unité alpha est composée de quatre domaines homologues, notés de I à IV, chacun est formé de 6 segments (S1 à S6) transmembranaires reliés entre eux par des boucles intra et extracellulaires. Ces domaines sont organisés de façon concentrique pour former le pore, le canal (figure 5).

Le S4 contient 4 résidus acides aminés chargés positivement qui se déplacent vers la face externe de la membrane. Ce réarrangement de la conformation du canal entraîne l'ouverture du pore formé par les S5, S6 et la boucle P extracellulaire qui les relie. L'inactivation, l'état dans lequel le canal ne laisse plus du tout passer d'ions, se fait lorsque la boucle intra cellulaire entre les domaines III et IV « bouche » le pore (inactivation rapide). (4-6)



A ce jour, 9 isoformes Nav ont été identifiés et décrits chez les mammifères, nommés de Nav1.1 à Nav1.9, différenciés selon les caractéristiques biophysiques, pharmacologiques (résistance à la TTX), etc (figure 6).

Table 1 Naming Convention for the Nine Known Subtypes of the Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels

Channel	Previous Name(s)	Genes
Na _v 1.1	Brain type I	<i>SCN1A</i>
Na _v 1.2	Brain type II	<i>SCN2A</i>
Na _v 1.3	Brain type III	<i>SCN3A</i>
Na _v 1.4	SkM1, μ 1	<i>SCN4A</i>
Na _v 1.5	h1, SkM2	<i>SCN5A</i>
Na _v 1.6	Brain type VI, Na6	<i>SCN8A</i>
Na _v 1.7	PN1, hNE, NaS	<i>SCN9A</i>
Na _v 1.8	SNS, PN3	<i>SCN10A</i>
Na _v 1.9	SNS2, NaN	<i>SCN11A</i>

hNE, human neuroendocrine; *NaN*, novel Na channel; *PN1*, peripheral nerve type 1; *PN3*, peripheral nerve type 3; *SNS*, sensory nerve specific; *SNS2*, sensory nerve specific 2.

Figure 6 Tous les canaux Nav et les gènes codant pour ces protéines ; à ce jour il a été décrit 9 isoformes dans la famille des canaux Na_v.

A cause de leur rôle crucial dans l'excitabilité neuronale et donc dans la régulation du réseau, les mutations des gènes codants pour ses isoformes, entraînent des « canalopathies » diverses, les plus connues étant l'épilepsie, douleurs neuropathiques...

Canaux Calciques Dépendant du Potentiel – Cav

La libération de neurotransmetteurs par les vésicules synaptiques est déclenchée par un influx d'ions Ca²⁺ au niveau des terminaisons synaptiques, à travers des canaux Ca²⁺ dépendant du potentiel. Ces canaux sont présents à la membrane des cellules excitables, et 10 isoformes ont été identifiés, répartis structurellement en 3 sous-familles (Cav1, Cav2, Cav3) (figure 7).

Table 1. Subunit composition and function of Ca²⁺ channel types

Ca ²⁺ current type	α1 Subunits	Specific blocker	Principal physiological functions	Inherited diseases
L	Ca _v 1.1	DHPs	Excitation-contraction coupling in skeletal muscle, regulation of transcription	Hypokalemic periodic paralysis
	Ca _v 1.2	DHPs	Excitation-contraction coupling in cardiac and smooth muscle, endocrine secretion, neuronal Ca ²⁺ transients in cell bodies and dendrites, regulation of enzyme activity, regulation of transcription	Timothy syndrome: cardiac arrhythmia with developmental abnormalities and autism spectrum disorders
	Ca _v 1.3	DHPs	Endocrine secretion, cardiac pacemaking, neuronal Ca ²⁺ transients in cell bodies and dendrites, auditory transduction	
N	Ca _v 1.4	DHPs	Visual transduction	Stationary night blindness
	Ca _v 2.1	ω-CTx-GVIA	Neurotransmitter release, Dendritic Ca ²⁺ transients	
P/Q	Ca _v 2.2	ω-Agatoxin	Neurotransmitter release, Dendritic Ca ²⁺ transients	Familial hemiplegic migraine, cerebellar ataxia
R	Ca _v 2.3	SNX-482	Neurotransmitter release, Dendritic Ca ²⁺ transients	
T	Ca _v 3.1	None	Pacemaking and repetitive firing	Absence seizures
	Ca _v 3.2		Pacemaking and repetitive firing	
	Ca _v 3.3			

Abbreviations: DHP, dihydropyridine; ω-CTx-GVIA, ω-conotoxin GVIA from the cone snail *Conus geographus*; SNX-482, a synthetic version of a peptide toxin from the tarantula *Hysterocrates gigas*.

Figure 7 Tous les canaux Cav, leurs bloqueurs spécifiques, leurs fonctions physiologiques chez l'humain et les pathologies associées à leurs perturbations. Les 10 isoformes de CaV sont répartis en sous types de courant calciques, L, N, P/Q, R et T.

De la même façon que les canaux Nav, les canaux Cav sont faits d'un complexe de 5 sous-unités : alpha1, alpha2, beta, gamma, et delta. La sous unité alpha1 qui forme le canal, est constituée de 4 domaines (I à IV) contenant chacun 6 segments transmembranaires (S1 à S6), avec le S4 sensible aux variations de potentiel de membrane, et une boucle extracellulaire entre S5 et S6 (qui forment le pore du canal) (figure 8).

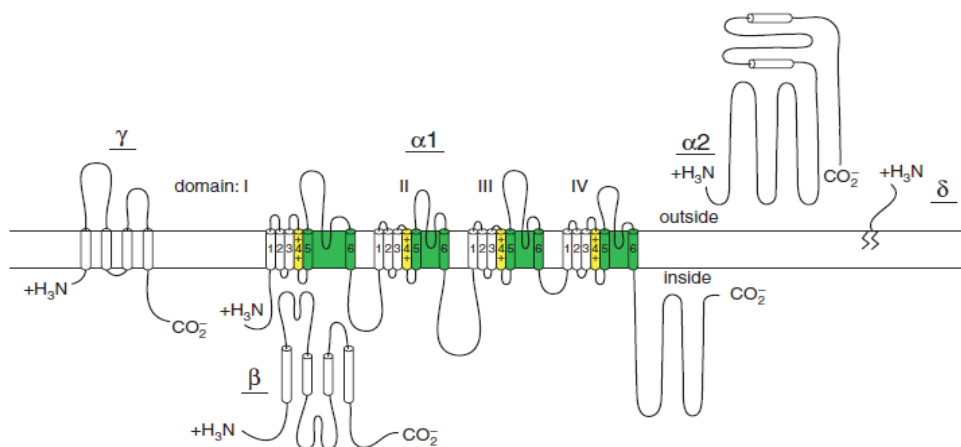


Figure 8 Structure des sous unités alpha 1, alpha 2, gamma et delta des canaux Cav ; la sous unité alpha 1 est composée de quatre domaines chacun contenant 6 segments transmembranaires.

Au niveau pré-synaptique, ce sont majoritairement les canaux Cav2.1 (type P/Q), mais aussi Cav2.2 (type N) Cav2.3 (type R), qui par l'influx de Ca^{2+} , sont impliqués dans la libération de neurotransmetteurs. (7)

Des mutations au niveau de ces types de Cav peuvent entraîner diverses pathologies et syndromes (épilepsies, migraine hémiplésique, hyperalgésie thermique...).

Canaux Potassiques Dépendant du Potentiel – Kv

Les canaux potassiques dépendant du potentiel sont activés par la dépolarisation de la membrane. Le flux sortant d'ions potassium à travers eux repolarise le potentiel de membrane pour mettre fin au potentiel d'action, puis l'hyperpolarise. Il joue aussi un rôle dans le potentiel de repos. De cette façon, les canaux potassiques contrôlent le signal électrique dans les cellules excitables et régulent les flux ioniques dans les cellules non excitables.

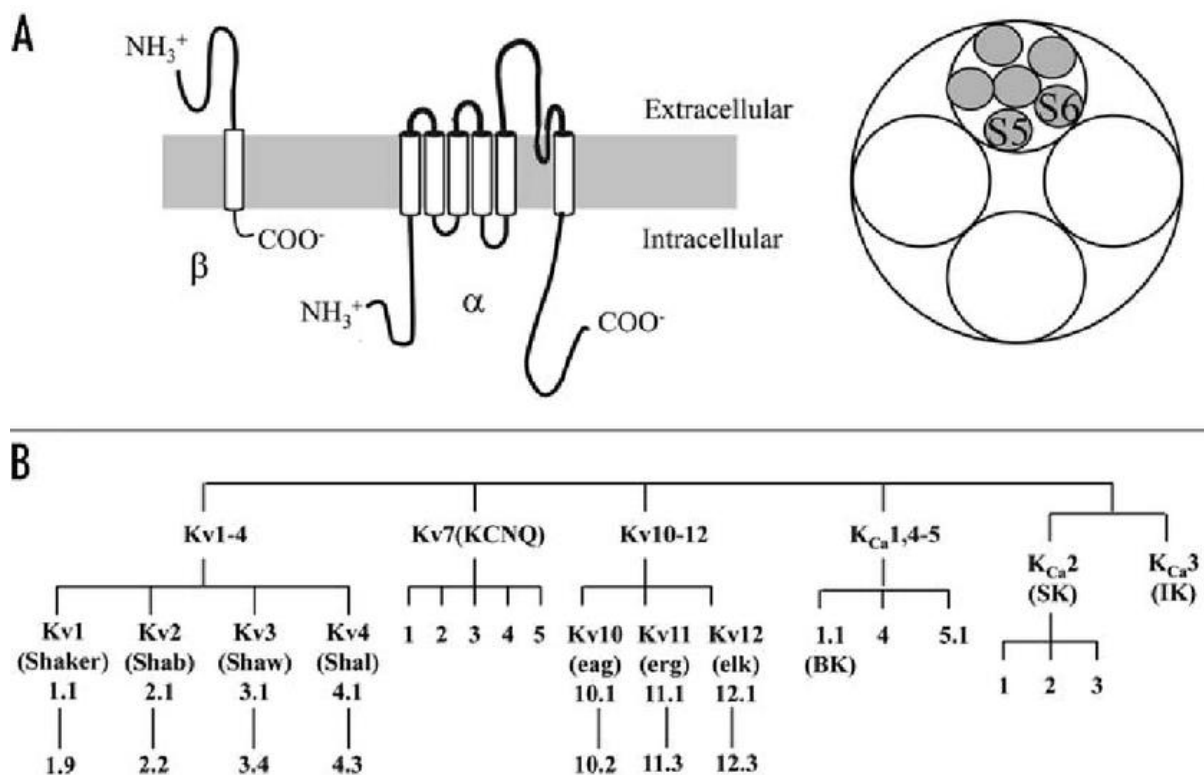


Figure 9. (A) Diagramme présentant la prédiction de la topologie de la sous unité alpha d'un canal Kv et la sous unité beta (gauche), et l'arrangement en tétramères des sous unités formant le pore (droite). (B) Famille des canaux potassiques dépendant du potentiel. (de Priest et al, 2008)

Les canaux Kv présentent une haute sélectivité ; certains canaux potassiques présentent une préférence pour le K^+ 1000 fois plus importante par rapport aux ions plus petits comme le Na^+ et le Li^+ . Ce haut degré de sélectivité est nécessaire pour maintenir le potentiel de

membrane, avec une forte concentration intracellulaire de K^+ et une forte concentration extracellulaire de Na^+ . Cette sélectivité est permise par la structure hautement conservée en séquence aminoacide qui forme le filtre de sélectivité aux K^+ dans le pore.

La famille des K_v contient 40 canaux différents qui sont répartis dans 12 sous familles distinctes basées sur leur homologie de séquences aminoacides (de K_v1 à K_v12). Les sous unités alpha peuvent s'assembler en homo ou hétéro tétramères, menant à une large diversité de complexes différents. La détection des variations du potentiel se fait au niveau des quatre premiers segments transmembranaires qui s'assemblent en un même domaine nommé *Voltage Sensing Domain* (VSD) (figure 9).

Canaux Potassiques à deux domaines pore (K2P)

Les canaux potassiques à deux domaines pore ou K2P constituent une grande sous famille de canaux potassiques, et structurellement bien distincte. Le génome humain contient 15 gènes codant pour des canaux K2P (KCNK), qui peuvent être divisés en six groupes distincts sur la base de leurs propriétés structurelles et fonctionnelles : TWIK, TASK, TREK, THIK, TALK et TRESK. Cependant les canaux K2P se différencient de la plupart des autres classes de canaux K^+ car ils s'assemblent en « dimères de dimères », avec chaque sous unité contenant 4 segments transmembranaires (TM1 à TM4). Ainsi deux des quatre domaines pores sont requis pour former un pore standard de canal K^+ tétramérique (figure 10).

Fonctionnellement, les canaux K2P agissent comme des canaux potassiques de fuite classiques, qui contribuent au potentiel de membrane de repos dans une grande variété de cellules dont les neurones, les myocytes squelettiques et myocardiques, la glie...

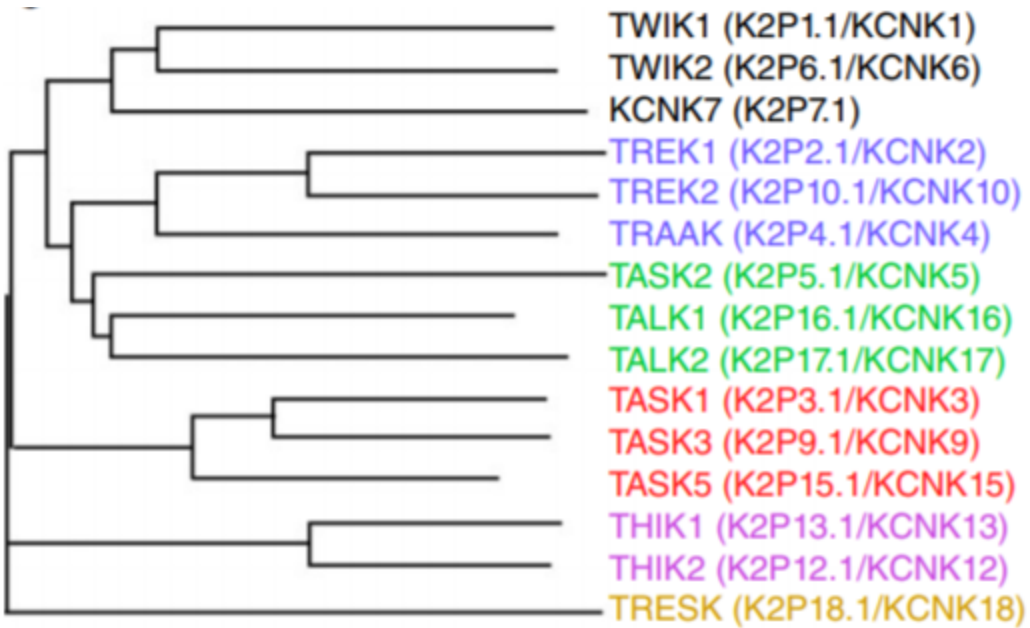


Figure 10 Canaux ioniques membres de la sous-famille des canaux K2P/KCNK ; les 15 canaux K2P sont répartis en 6 grands types (modifié depuis Feliciangeli et al, 2015)

En conséquence, ces canaux présentent les motifs de régulation les plus polyvalents connus chez les classes de canaux ioniques. Par exemple, le canal TREK 1 peut être régulé par des facteurs physiques comme le potentiel, la température et l'étirement de la membrane, aussi bien que par des agents chimiques et des ligands naturels dont des protons intra et extracellulaires, des acide gras poly insaturés, etc. Durant la dernière décennie, l'importance physiologique et physiopathologique des canaux K2P est devenue très claire et représente maintenant d'importantes cibles thérapeutiques dans les maladies cardiovasculaires, les troubles dépressifs et de mémoire, la migraine...

MIGRAINE

Historique

La migraine n'est pas une pathologie récente ou moderne. La céphalée classique et la migraine sont connues depuis des millénaires, et décrites dans d'anciens documents de l'Antiquité. Ainsi, le **Papyrus Ebers**, l'un des plus anciens traités médicaux connus à ce jour, daté de 1200 avant JC, décrit des affections comme la migraine, la névralgie...

Plus tard, au 4^{ème} siècle avant JC, **Hippocrate** détaille grâce à son expérience personnelle, ce que l'on connaît comme une *Migraine Avec Aura* : une lumière scintillante, souvent à l'œil droit, suivie d'une violente douleur partant des tempes et qui s'étend à l'ensemble de la tête et de la nuque.

Le terme Migraine est introduit au 2^{ème} siècle avant JC par **Galen** ; il est dérivé du terme *Hémicrânie*, issu de la caractéristique majoritairement unilatérale de cette affection.

L'Abbesse **Hildegarde de Bingen** décrit dans ses manuscrits des visions attribuées bien plus tard à des aura migraineuses, du type lumière scintillante qui se déplace dans le champ de vision, suivie d'une tache sombre.

Thomas Willis père de la Neurologie en 1683 décrit le cas d'une jeune femme présentant des épisodes de sévère céphalée migraineuse associés à des vomissements, et précédés de signes prodromiques.

C'est en 1783 que la distinction est faite entre Migraine et Céphalée classique, par **Tissot**.

La Migraine est aussi présente dans la littérature. Dans les œuvres « Alice Au Pays des Merveilles » et « A travers le Miroir » **Lewis Carroll** décrit des phénomènes migraineux associés à des aura d'une forme bien particulière : vision en tunnel, vertige, phonophobie, sensation d'élongation du corps, hallucination visuelles... Plus tard cette aura migraineuse spécifique sera nommée « Syndrome d'Alice Au Pays des Merveilles ».

La Migraine interroge et fascine. Si les premières spéculations sur les causes possibles de cette douleur si particulière remontent à l'Antiquité, il faut attendre le 19^{ème} siècle pour voir posées les premières théories sur l'origine de la Migraine.

Au 19^{ème} siècle, **Dubois Reymond**, **Mollendorf** ainsi qu'**Eulenburg** posent les **théories vasculaires** sur l'origine de la migraine. En 1873 **Liveing** est à l'origine de la **théorie**

neurale de la migraine, attribuant l'affection à une « perturbation du système nerveux autonome » qu'il appelle « tempête neurale ».

La Migraine est un trouble neurologique commun, caractérisé par une céphalée invalidante. Elle touche 12% de la population française et affecte plus souvent les femmes (18%) que les hommes (6%), avec une origine remontant généralement à l'enfance ou l'adolescence (8).

Migraines

Dans la 3^{ème} édition de l'**International Classification of Headache Disorders**, on distingue deux types principaux de migraine : la **Migraine Sans Aura** et la **Migraine Avec Aura**.

La **Migraine Sans Aura** est caractérisée par une céphalée primaire pouvant durer de 4 à 72 heures présentant des caractéristiques particulières, associées à des symptômes autonomes. Elle est décrite comme une céphalée récurrente, pulsatile, se différenciant de la céphalée classique (ou mal de tête). Elle est ressentie majoritairement unilatéralement, d'une intensité variable qui s'aggrave par une activité physique. Les symptômes associés à cette céphalée sont des nausées et/ou une hypersensibilité sensorielle, comme une photophobie, phonophobie, etc, et une allodynie cutanée.

La **Migraine Avec Aura** a la particularité de présenter avant, voire pendant la céphalée de migraine, des troubles neurologiques transitoires sensoriels ou langagiers, appelés Auras. Elles peuvent prendre différentes formes, visuelles, motrices, sensorielles, aphasiques. L'aura visuelle est le type d'aura le plus commun ; la migraine avec aura visuelle est communément appelé *Migraine Ophthalmique*. Elle peut se présenter sous la forme de tâches lumineuses dans le champ de vision, comme des lucioles (phosphènes), de scintillements (scotomes scintillants) ou de tâches sombres (scotomes) gênant la vision (9).

Certains patients migraineux peuvent expérimenter une phase de signes pro et/ou post-dromiques dans les vingt-quatre heures précédant ou suivant la crise de migraine. Ces signes peuvent être de l'hyperactivité ou de l'hypoactivité, une sensation de besoin en aliments spécifiques ou une perte d'appétit, une déprime, une irritabilité, une fatigue...

Une migraine est considérée comme chronique si la céphalée survient au moins 15 jours par mois, pendant plus de trois mois, avec au moins 8 jours par mois de céphalée migraineuse. Chroniques, ces migraines peuvent être extrêmement invalidantes et altérer la qualité de

vie des patients puisqu'ils peuvent développer une fatigue chronique, de l'anxiété, des insomnies, une dépression. De ce fait, la migraine est un réel problème de santé publique (8). Différents facteurs favorisent le déclenchement de crises de migraine : des facteurs sensoriels (lumière, odeur, chaleur...), hormonaux, alimentaires (alcool, excitants, plats gras...), psychologiques (anxiété, stress, dépression...), etc (10).

Céphalée Migraineuse

La céphalée particulière, pulsatile, si caractéristique de la Migraine, provient de l'activation et la sensibilisation de la voie TrigéminoVasculaire (TGV). La voie TGV fait le relai entre signaux douloureux périphériques et le cerveau.

Les méninges qui recouvrent et protègent le cerveau et leurs gros vaisseaux sont innervés par des afférences nociceptives périphériques provenant du ganglion trigéminal. Le ganglion projette aussi centralement vers le noyau spinal trigéminal (SpV). Celui-ci envoie des connexions vers :

* Les noyaux du Tronc Cérébral, les Noyaux Hypothalamiques et les Noyaux des ganglions de la base. Ces connexions joueraient un rôle dans les symptômes associés à la céphalée comme les nausées, vomissements, fatigue, etc.

* Les noyaux thalamiques VentroPostéroMedial et Postérieur (Po/VPM) qui relient les afférences vers le cortex somatosensoriel, insulaire, pariétal, visuel, auditif, olfactif... ce qui expliquerait les autres symptômes associés à la migraine : troubles visuels, photophobie, maladresse, etc.

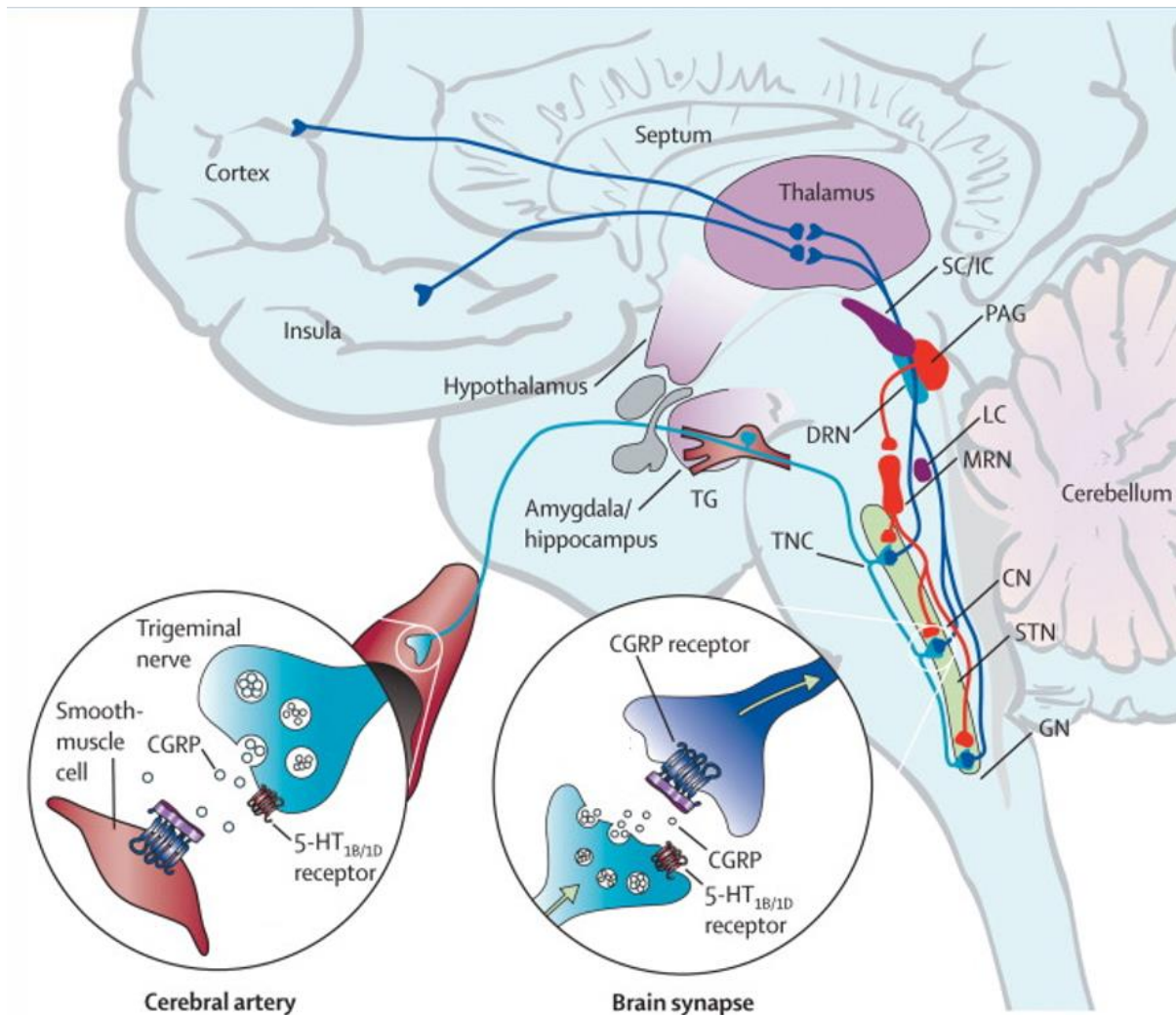


Figure 11 Structures de la Voie Trigéminal de la Douleur, impliquée dans la Céphalée migraineuse, avec localisation de l'expression et libération des neuropeptides transmettant le signal. Le ganglion trigéminal envoie des afférences primaires qui font synapse avec les vaisseaux sanguins méningés et le complexe trigéminal dans la moelle épinière. Des neurones de ce complexe se projettent et se connectent aux structures thalamiques et hypothalamiques. Les neurones projetés par ces noyaux font synapse avec le cortex. (modifié depuis MacGregor, 2011)

L'activation de la voie TGV peut se faire par activation directe des nocicepteurs méningés, par la vasodilatation des gros vaisseaux méningés, qui vont envoyer le signal vers le ganglion TG. Mais aussi par la mise en place d'une neuro inflammation et la libération de protéines pro inflammatoires qui activeront les afférences méningées.

La sensibilisation survient une fois l'activation en place. Au niveau périphérique elle se traduit par un abaissement du seuil d'activation des neurones TG, une amplification de leur réponse et des réponses à des stimuli qui ne devraient pas entraîner de réponse. La sensibilisation périphérique est responsable de la douleur pulsatile.

Au niveau central, elle se présente comme une augmentation de l'activité spontanée des neurones du TNC SpV et du Po/VPM, ainsi qu'une réponse à des stimuli normalement silencieux. Cette sensibilisation centrale est à l'origine de l'allodynie associée à la céphalée migraineuse. (11, 12) (figure 12)

Migraine Hémiplégique

Il existe des formes particulièrement sévères mais rares de Migraine avec Aura, où les patients présentent des problèmes moteurs pendant l'aura, comme une ataxie, une hémiplégie, ou une faiblesse musculaire unilatérale (ICHD). On parle de **Migraine Hémiplégique**, et les crises de MH commencent généralement à l'âge de 10 ou 20 ans. Si le cas est isolé (sans historique familial), il s'agit d'une **Migraine Hémiplégique Sporadique**. Si au contraire le patient a au moins un parent du 1^{er} ou 2nd degré présentant les mêmes symptômes, on parlera de **Migraine Hémiplégique Familiale**. Dans les cas les plus sévères, la crise de MH s'accompagne d'une ataxie cérébelleuse permanente, des crises d'épilepsie, un œdème cérébral, un coma... (figure 12)

Des études génétiques familiales ont montré que la MH est une pathologie génétique, à transmission autosomale dominante, provoquée par la mutation d'un gène. La forme sporadique de MH serait due à une mutation *de novo*, ou à la transmission de la mutation par un parent asymptomatique. Le séquençage a permis d'identifier les gènes impliqués, et à ce jour 3 gènes mutés sont retrouvés dans les cas de MHF et MHS. Jusqu'à présent, 200 familles touchées par la MHF et 200 personnes présentant un MHS ont été identifiés (13). (figure 13)

Tableau 1 – Critères diagnostiques de la MHF selon la classification de l’IHS 2004
Diagnosis criteria of FHM according to the IHS 2004 classification

A	Au moins deux crises satisfaisant les critères B et C.
B	Aura comportant un déficit moteur entièrement réversible et au moins l'un des signes suivants : signes visuels entièrement réversibles incluant des éléments positifs (phosphènes, taches ou lignes lumineuses) et/ou négatifs (perte de vision) symptômes sensitifs entièrement réversibles subjectifs (fourmillements) et/ou objectifs (hypoesthésie) des troubles du langage de type dysphasique entièrement réversibles
C	Au moins deux des caractéristiques suivantes : l'un des symptômes de l'aura au moins s'installe progressivement en ≥ 5 minutes et/ou les différents symptômes de l'aura s'installent successivement ≥ 5 minutes. chaque symptôme de l'aura dure ≥ 5 minutes et < 24 heures céphalée satisfaisant les critères B–D de la migraine sans aura (item 1.1) ^a commençant pendant l'aura ou dans les 60 minutes suivant la fin de l'aura.
D	Au moins un apparenté au premier ou au second degré a eu des crises satisfaisant les critères A–E.
E	Au moins l'un des caractères suivants : l'histoire, l'examen physique et neurologique ne suggèrent pas de trouble organique l'histoire, l'examen physique et neurologique suggèrent un trouble organique, mais celui-ci est écarté par la neuroimagerie ou tout autre procédé de laboratoire un trouble organique existe mais les crises migraineuses ne sont pas apparues pour la première fois en liaison temporelle avec celui-ci

^a Critères diagnostiques de la migraine sans aura selon l’IHS.

Figure 12 Critères diagnostiques de la MHF ; la MHF est déclarée si les patients présentent au moins les conditions B et C. On parlera d'un MH sporadique s'il n'existe pas d'histoire familiale de migraine hémiplégique.

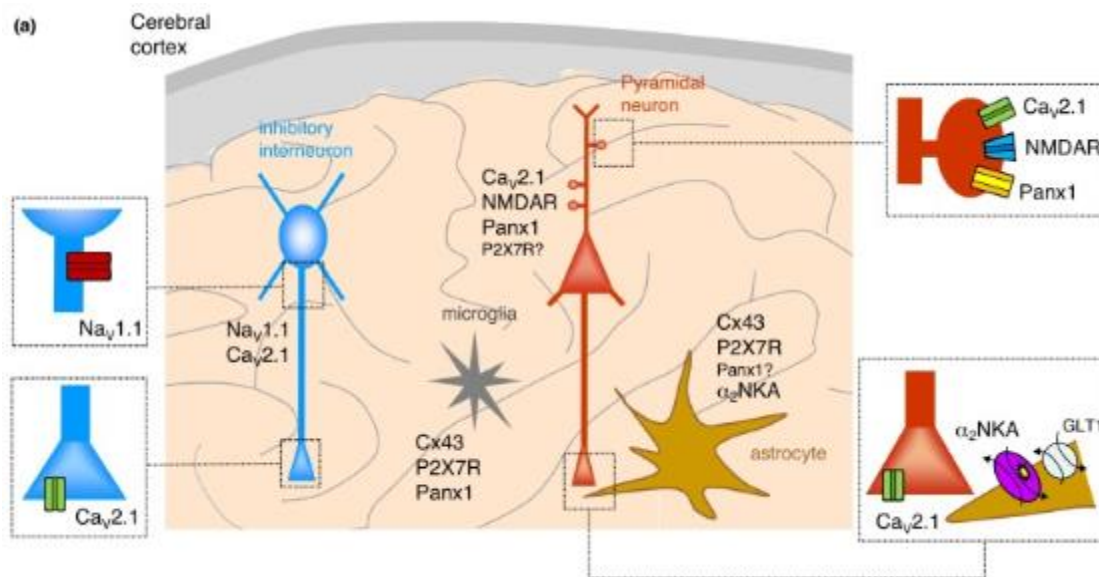


Figure 13 Localisation cellulaire et subcellulaire des canaux ioniques impliqués dans la physiopathologie de la migraine, et en particulier de la MHF. (de Pietrobon 2018)

CACNA1A – MHF type 1

Le premier gène identifié responsable de la MHF est **CACNA1A**, localisé sur le chromosome 19p13, qui code pour la sous unité alpha1 du canal calcique Cav2.1 (14). Comme présenté précédemment, les canaux Cav permettent suite à la dépolarisation par le PA, l'influx calcique à l'origine de la libération du glutamate par les vésicules synaptiques. A ce jour

toutes les mutations MHF 1 connues de ce gène sont des mutations faux-sens d'un seul acide aminé. Selon les mutations, les signes cliniques peuvent être très sévères, allant jusqu'à l'œdème cérébral et le coma suite à un traumatisme crânien (15).

Des études électrophysiologiques de ces mutations montrent un gain de fonction de ce canal, avec un abaissement du seuil d'activation et une augmentation de la probabilité d'ouverture (16–18).

Deux modèles de souris MHF 1 ont été développées. L'un portant la mutation **R192Q** et l'autre la mutation **S218L**. La mutation S218L provoque chez les patients, une forme très sévère de MHF, phénotype retrouvé chez les souris KI S218L (19). Tandis que la mutation R192Q entraîne une forme modérée de MHF.

Les souris MHF 1 présentent des phénotypes retrouvés chez les patients : photophobie, hémiparésie et céphalée (20). L'induction de dépression corticale envahissante (DCE) chez ces souris, est suivie d'une hémiparésie (plus sévère chez les souris S128L) qui peut durer une heure et demi (21).

Le canal Cav2.1 (P/Q) est largement exprimé dans le système nerveux, incluant toutes les régions du cerveau impliquées dans la pathogenèse de la migraine. Il est essentiel pour contrôler la libération de neurotransmetteurs dans la plupart des synapses centrales, par la régulation de l'influx Ca^{2+} dans les terminaisons synaptiques. D'autres mutations de ce canal, qui ne provoquent pas la MHF 1, sont associées à des ataxies épisodiques, des ataxies spino-cérébrales de type 6, et une combinaison d'ataxie cérébrale progressive et d'épilepsie.

Les analyses des propriétés fonctionnelles de ces mutants MHF 1 ont été réalisées en utilisant des lignées cellulaires hétérologues humaines, ou des neurones issus de souris *Knock-In* (KI) portant les mutations MHF 1 (incluant les neurones corticaux et du trijumeau). Ces études ont montré que les mutations MHF 1 induisent un gain de fonction des canaux Cav2.1, principalement à cause de l'augmentation de la probabilité d'ouverture du canal et l'activation à des dépolarisations plus basses.

Dans le néocortex des souris KI MHF 1, l'induction de la DCE par de brèves injections de KCl était facilitée et sa propagation accélérée. De plus, la transmission synaptique excitatrice a été augmentée à cause de la libération de glutamate évoquée par potentiels d'action au niveau des synapses des cellules pyramidales. De façon remarquable, la neurotransmission synaptique GABAergique des interneurons "Fast-Spiking" reste non altérée, probablement

à cause de l'expression dans ces neurones de canaux Cav2.1 spécifiques qui sont sensibles différemment aux mutations FHM 1. De façon notable, les souris KI portant la mutation MHF 1 S218L, qui provoque des phénotypes particulièrement sévères chez l'humain, présentent un phénotype sévère incluant des crises tonico-cloniques généralisées et une ataxie.

ATP1A2 – MHF type 2

Le second gène identifié à l'origine de la MHF est **ATP1A2**, localisé sur le chromosome 1q23, qui code pour la sous-unité alpha2 de la pompe Na⁺K⁺ATPase, exprimée à l'âge adulte dans les astrocytes, et qui intervient entre autre dans la recapture du glutamate. Les mutations peuvent être faux sens ou délétion, entraînant une perte de fonction de la pompe (22). Cliniquement, la MHF 2 peut inclure un retard mental dans sa forme la plus sévère (23).

Il existe actuellement un seul modèle de souris de MHF 2 portant la mutation **W887R**. La particularité de cette mutation est d'entraîner une forte mortalité à la naissance chez les souris homozygote. Les souris hétérozygotes ne présentent pas de phénotypes délétères particuliers. La mutation entraîne une réduction de moitié de l'expression de la protéine (11).

La sous-unité alpha2 des pompes Na⁺ K⁺, cible des mutations MHF 2, est principalement exprimée dans les astrocytes chez l'adulte. Ces pompes ont probablement un rôle important dans la recapture du glutamate, à cause de son couplage fonctionnel avec le transporteur glial du glutamate dans le processus cellulaire qui entoure les synapses glutamatergiques. L'absence de la pompe alpha2 Na K dans le processus astrocytaire autour des terminaisons GABAergiques suggère qu'elle n'est pas impliquée dans la neurotransmission inhibitrice. Les mutations MHF 2 réalisées dans les clones humains et exprimées dans des lignées cellulaires, induisent une perte de fonction complète ou partielle des pompes Na K à cause de perturbations fonctionnelles, dont une perte ou une réduction de l'activité catalytique, ou une diminution du ciblage à la membrane plasmique. De façon consistante, des immunoblots issus de cerveaux de souris KI MHF 2 montrent un signal réduit pour la pompe alpha2 Na K. Ces souris présentent aussi une susceptibilité d'induire une DCE augmentée et une propagation de DCE accélérée dans le néocortex.

Récemment, il a aussi été montré que dans ces souris il y a une densité réduite de transporteurs de glutamate GLT-1a dans les processus corticaux péri-synaptiques astrocytaires, et que le défaut de clairance en glutamate peut expliquer la plupart des facilitations observées.

De façon similaire, les résultats obtenus avec un autre modèle de souris KI MHF 2 souligne une clairance en glutamate réduite comme le mécanisme de certaines comorbidités psychiatriques.

Ces résultats montrent que le gain de fonction de Cav2.1 ou la perte de fonction de la pompe alpha2 Na K conduit à une facilitation de la DCE à cause de l'augmentation de la libération de glutamate par les synapses excitatrices ou à cause de la diminution de la clairance en glutamate par les astrocytes.

SCNA1 – MHF type 3

Le canal sodique Nav1.1, qui est la cible des mutations MHF 3, est exprimé majoritairement dans les neurones inhibiteurs GABAergiques, dans lesquels il a un rôle clé dans la génération des potentiels d'action dans le segment initial de l'axone. Les 11 mutations identifiées dans MHF 3 sont toutes des mutations faux-sens. La plupart des résultats expérimentaux montrent qu'elles provoquent un gain de fonction du Nav1.1.

La première étude fonctionnelle a été réalisée pour la mutation **Q1489K**, identifiée dans trois familles et dans lesquelles un patient avait une épilepsie focale pendant son enfance avant la déclaration de la MHF. Cette étude avait utilisé le canal cardiaque Nav1.5 à cause de problèmes techniques rencontrés avec le clone humain Nav1.1. Une modification des propriétés de *gating* a été identifiée, et accélérât le recouvrement depuis l'inactivation rapide, cohérent avec un gain de fonction modéré.

En général, un gain de fonction peut être observé chez tous les mutants MHF Nav1.1 étudiés. De façon intéressante, quand les clones Nav1.1 humains sont étudiés, tous présentent une augmentation du courant persistant. Les résultats obtenus soulignent une augmentation de l'excitabilité des neurones GABAergiques dans MHF 3, un mécanisme différent et contre-intuitif en comparaison aux mutations MHF 1 et 2 (qui souvent ont des phénotypes cliniques différents, comme présentés plus haut), et en comparaison des mutations épileptogènes Nav1.1.

L'hypothèse est que ces mutations conduiraient à la DCE, mais il n'est pas encore clair si et comment le gain de fonction du Nav1.1 conduisant à une augmentation de l'activité des neurones GABAergiques pourrait déclencher la DCE, au lieu de diminuer l'excitabilité du réseau.

A l'heure actuelle, il n'y a pas de modèle de souris KI MHF 3 disponible.

Migraine avec Aura et Mutation TRESK

Les mutations des canaux ioniques dans la MHF présentées plus haut ne sont pas retrouvées dans des cas typiques de migraine avec aura. D'autres types de canaux ioniques pourraient donc être impliqués dans ces cas-là.

Les canaux K2P sont exprimés dans tout le système nerveux central et ont un rôle clé dans le contrôle du potentiel de membrane de repos et l'excitabilité neuronale (24).

Récemment, une mutation dominant négatif d'un gène codant pour un canal K2P a été identifiée dans une famille de patients présentant une migraine avec aura avec un fort terrain héréditaire. La mutation **F139WfsX24** est localisée sur le gène KCNK18 qui code pour le canal K2P TRESK, et engendre un canal tronqué (délétion de 2bp) (25). La protéine exprimée est non fonctionnelle et sert de dominant négatif qui régule négativement le fonctionnement de la protéine *wild type*. Cette étude détermine de plus l'expression du gène chez la souris principalement dans le ganglion trijumeau, les DRG et dans les ganglions du système nerveux périphérique. Cette expression dans les DRG et le trijumeau, suggère qu'elle se fait aussi dans KCNK18 dans les fibres B et les fibres C. Chez l'humain, l'étude montre une expression du canal dans la moelle épinière et des structures internes du cerveau, impliquées dans la voie trigéminal de la douleur. Il a été montré dans d'autres études, que des mutations des canaux TRESK entraînent une hyperexcitabilité des neurones du trijumeau, suggérant un rôle dans le développement de la migraine.

Dans une étude suivante, la même équipe a identifié une autre mutation perte de fonction (Cys110Arg) retrouvée non seulement chez des migraineux mais aussi chez des personnes non touchées. Evidemment, un seul variant TRESK non fonctionnel, n'est pas suffisant pour provoquer la migraine. De plus, plusieurs personnes peuvent être porteuses de mutations délétères sans pour autant présenter les symptômes de la pathologie. Si KCNK18 est un gène de la migraine, son rôle est probablement restreint à seulement peu de cas car plus de 500 patients migraineux ont été testés négatifs pour les mutations KCNK18. Cependant TRESK est resté une cible intéressante à cause de son expression dans les neurones trigéminaux et son rôle présumé dans la réduction de l'excitabilité neuronale dans des conditions inflammatoires.

Migraine et Hyperactivité Corticale

L'hypersensibilité sensorielle et l'hyperalgésie périphérique qui peuvent être observées entre les crises de migraines chez les patients et explorées expérimentalement (26), ainsi que les

symptômes prodromiques survenant 24h avant la crise (difficultés langagières, irritabilité, etc), suggèrent une perturbation primaire (déjà installée) de l'excitabilité corticale. Actuellement, l'analyse de l'excitabilité corticale entre deux crises peut se faire par stimulation transcrânienne magnétique (TMS) ou IRM fonctionnelle par exemple, mais les études présentent des résultats contradictoires, où l'activité corticale est augmentée ou au contraire réduite. (27) Cependant ces résultats montrent tout de même qu'il existe bien un problème d'excitabilité, où la régulation entre excitation et inhibition est perturbée. Compte tenu des formes différentes que la migraine peut avoir d'une personne à l'autre, ces « contradictions » peuvent refléter la multiplicité des mécanismes (hypoactivation ou hyperactivation) sous-jacents à la crise de migraine.

La migraine présente une comorbidité avec l'épilepsie, la deuxième affection neurologique juste après la migraine. L'épilepsie est provoquée par un déséquilibre de la balance excitation/inhibition conduisant à une hyperexcitabilité cérébrale. Elle se caractérise par des crises paroxystiques causées par des décharges anormales et simultanées d'un large réseau de neurones. Les patients épileptiques semblent plus susceptibles de subir des crises de migraine, et la fréquence de survenue de crises d'épilepsie serait plus grande chez des patients migraineux, que la population saine (28). De plus dans au moins deux des trois types de MHF (1 et 2), les patients peuvent expérimenter des crises d'épilepsies en lien avec la mutation, phénotype retrouvé dans les modèles de souris (11). Chez les patients MHF 3 la survenue de crises et si elles sont liées à la mutation du Nav1.1 ou la présence d'un polymorphisme génétique reste encore à déterminer.

Si l'on met en parallèle migraine et épilepsie, l'hypothèse sur la nature des perturbations d'excitabilité corticale dans la migraine pourrait pencher en faveur d'une hyperexcitabilité. Il est maintenant admis que le corrélat électrophysiologique de l'aura dans la Migraine Avec Aura est un phénomène appelé Dépression Corticale Envahissante, qui hyperactiverait puis déprimerait les régions corticales sensorielles associées aux natures des auras (visuelles, olfactives, langagières...).

L'étude de la Dépression Corticale Envahissante comme conséquence et preuve d'une hyperexcitabilité corticale permet peu à peu de dévoiler les mécanismes possibles de la migraine, non seulement au niveau des auras, mais aussi au niveau du déclenchement de la céphalée.

DEPRESSION CORTICALE ENVAHISSANTE

Découverte de la DCE par A.A.P. Leão

La Dépression Corticale Envahissante fut décrite pour la première fois en 1944 par Aristide Leão, comme une dépression de l'activité électrique spontanée dans le cortex cérébral. La première intention de Leão était de rassembler des données d'EEG corticaux en situation « d'épilepsie expérimentale ».

Sur lapins anesthésiés, il appliqua des stimulations électriques tétaniques répétées pendant 1 à 5 secondes ; 10 à 20 secondes suivant la stimulation, il observa une réponse constituée d'une **dépression remarquable de l'activité électrique spontanée**, et un retour de cette activité 5 minutes après les premiers signes de dépression. Cette dépression pouvait être induite partout dans le cortex, avec une intensité de stimulation variable selon les régions.

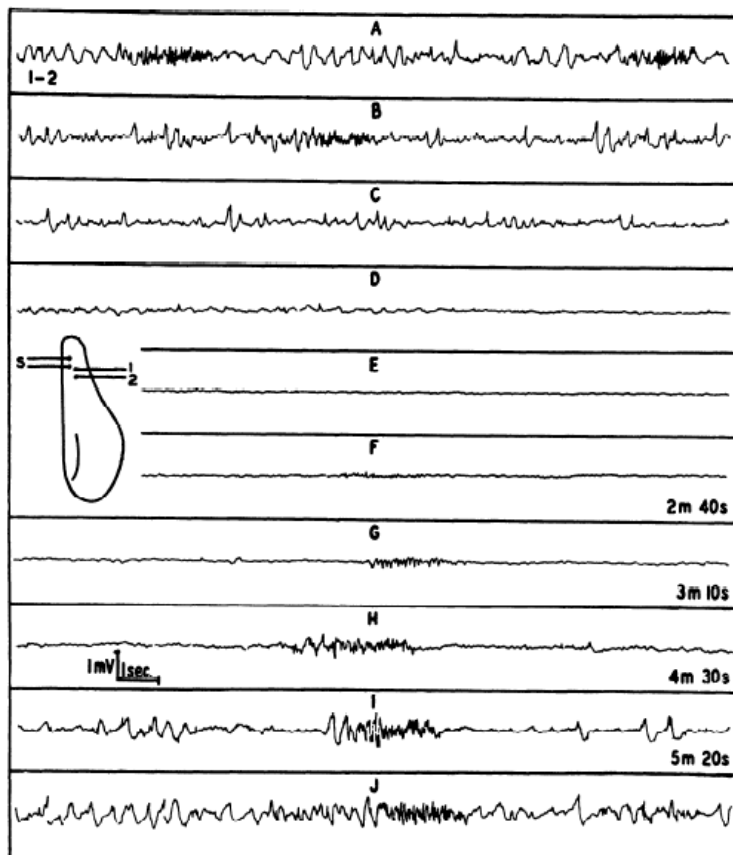


Figure 14 Enregistrements EEG corticaux réalisés par Leão, de la dépression de l'activité électrique spontanée dans la région stimulée. Il est observé un retour complet de l'activité spontanée 5 minutes après.

Il décrit une **progression lente** et **multidirectionnelle** depuis la zone d'induction. Dans toutes les régions que la dépression traversait, les EEG montraient le même profil électrique que ceux observés dans la zone d'induction, avec une perte transitoire de l'activité spontanée et un **retour progressif**. Elle pouvait être ralentie ou stoppée par l'application d'hydrochloride de cocaïne sur le chemin de la dépression ; la présence d'une lésion en aval de la zone d'induction, empêchait sa propagation.

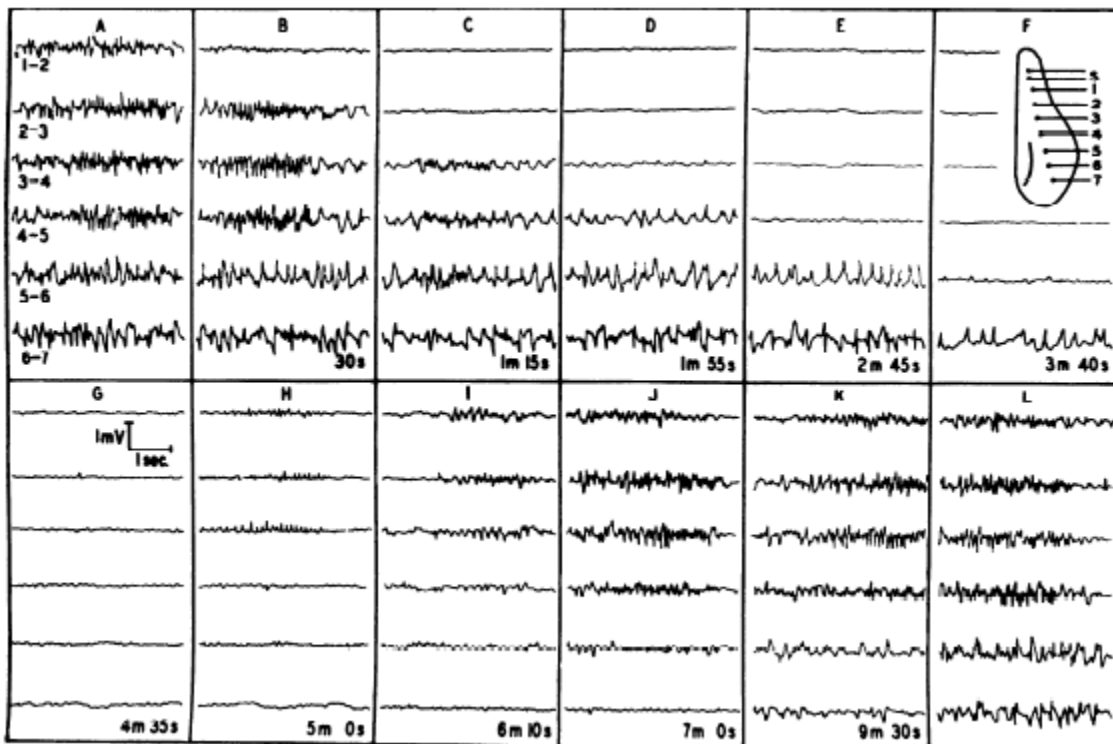


Figure 15 Enregistrements réalisés à l'aide de plusieurs électrodes disposées réparties à travers l'hémisphère, révélant la propagation de la dépression et du retour de l'activité spontanée.

Si la stimulation était plus intense, une dépression pouvait être aussi observée dans l'autre hémisphère après un certain délai, ayant pour résultat la propagation simultanée mais décalée de deux dépressions.

En plus de la stimulation électrique, Leão observa que cette dépression pouvait être induite mécaniquement, en appliquant de légères pressions sur le cortex avec une tige en verre, sans endommager les tissus. Le phénomène de dépression induit par cette technique présentait le même profil que celui décrit précédemment.

Depuis, ce phénomène nommé désormais **Dépression Corticale Envahissante** ou **DCE** (*Cortical Spreading Depression*) est largement étudié expérimentalement. (29)

Description de la DCE

La Dépression Corticale Envahissante est une vague de forte dépolarisation corticale qui se propage lentement (2 à 6 mm/min) au sein du tissu nerveux. Cette dépolarisation constitue la première phase du phénomène et dure une minute. Elle est suivie d'une période de silence électrique de l'activité corticale des neurones et astrocytes (**dépression**) de plusieurs minutes, la dépolarisation de neurones est telle que la génération de potentiels d'action devient impossible. Cette dépression se traduit sur un électroencéphalogramme (EEG) par exemple, par un silence électrique de plusieurs minutes.

Lors de l'étude de cette nouvelle vague de dépolarisation par stimulation électrique, Leao la décrit comme une variation importante du courant direct (ou DC shift noté ΔV_0) en deux phases : un **premier pic négatif rapide** (jusqu'à -15 mV) puis soit un plateau moins négatif, soit un **second pic négatif plus lent**.

Ces dépolarisations paroxysmiques des cellules neuronales et gliales, s'accompagnent aussi d'un **effondrement de l'homéostasie ionique** et une perturbation importante des gradients ioniques qui traversent la membrane : une augmentation rapide du $[K^+]_e$ (de 3 à 60 mM), une diminution rapide du $[Na^+]_e$ et du $[Cl^-]_e$ (de 140 à 50 mM) et du $[Ca^{2+}]_e$ (de 1.0 à 0.2 mM). (11) (Figure 14) On peut observer une libération massive de neurotransmetteurs (tels que le glutamate et le GABA), un gonflement cellulaire causé par un état d'hyperosmolarité, une augmentation du métabolisme énergétique et des modifications du flux sanguin cérébral (30, 31). Cependant, malgré ces perturbations sur le passage de la DCE aucune mort cellulaire n'est observée, ni de dommage permanent du tissu cérébral. (32) Cependant, elle impose une charge bioénergétique importante au cerveau.

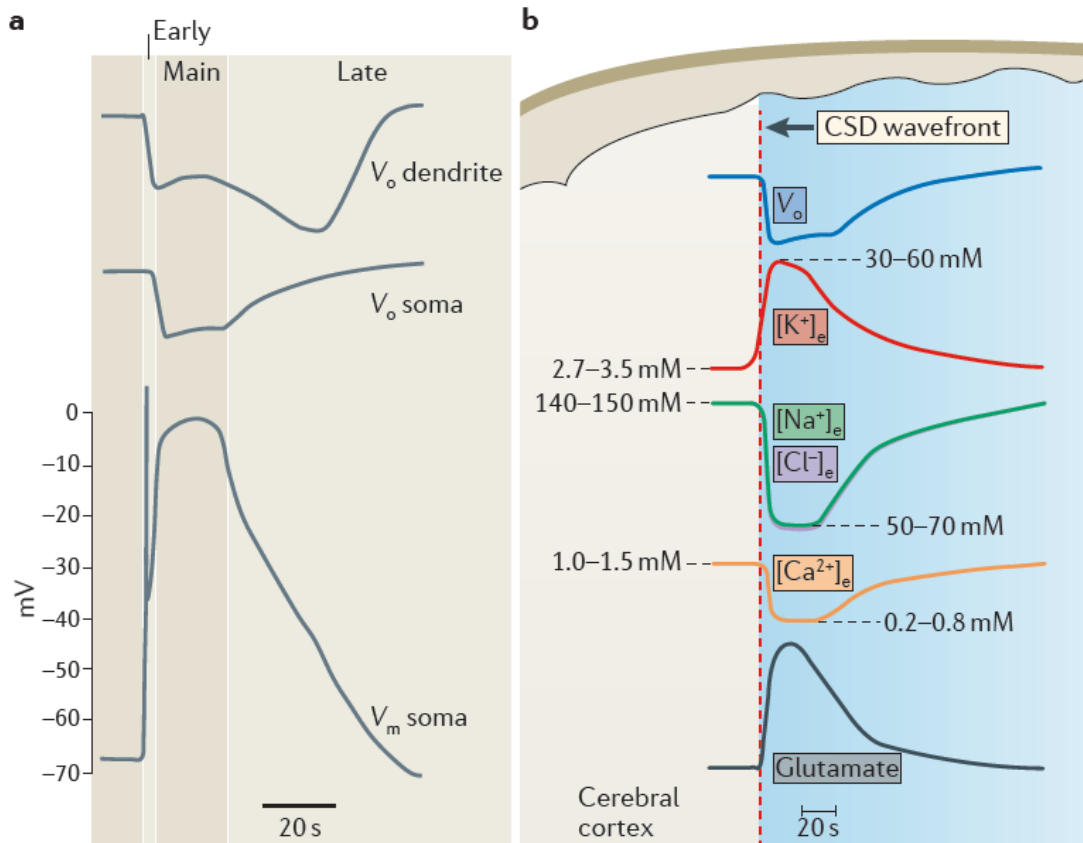


Figure 16 Caractéristiques électrophysiologiques de la DCE et modification ioniques associées. Lors d'une DCE, les concentrations extracellulaires en K^+ et glutamate augmentent, et celles en Na^+ , Cl^- et Ca^{2+} diminuent.

Une hyperexcitabilité locale et synchrone des circuits neuronaux dans le cortex cérébral précède la DCE, donc les modulations de l'excitabilité neuronale doivent être liées aux attaques de migraine. Les patients migraineux avec ou sans aura subissent plus d'inconforts et d'hallucinations visuels que des sujets contrôles lorsqu'ils sont confrontés à des stimuli visuels, et ce genre de stimuli peut déclencher une crise de migraine. Ces anomalies impliquent donc probablement un dysfonctionnement du cortex visuel compatible avec hyperexcitabilité corticale, particulièrement dans le cas de Migraine Avec Aura. D'un point de vue moléculaire et cellulaire, cette hyperexcitabilité conduit à une augmentation de la concentration en ion potassium dans le milieu extracellulaire, ion libéré par les neurones actifs, et de glutamate, neurotransmetteur excitateur, qui génèrent une dépolarisation auto-entretenu. D'un côté l'augmentation de K^+ extracellulaire dépolarise la membrane des neurones, de l'autre côté le glutamate libéré par les neurones excitateurs pré-synaptiques se fixe et active les récepteurs post synaptiques NMDA et AMPA-Kaïnate, qui sont des canaux calciques et sodiques, et donc un influx de cations qui dépolarise les neurones.

DCE expérimentale

Il est possible d'induire et étudier expérimentalement la DCE, et l'approche pharmacologique permet d'identifier les acteurs de son induction. La DCE expérimentale nécessite l'application d'un très fort stimulus dépolarisant qui entraîne une augmentation du potassium extracellulaire :

- Par stimulation électrique brève et répétée
- Par l'application locale d'une solution hautement concentrée en potassium
- Par l'ajout de glutamate

Bien que ces diverses méthodes soient bien décrites et couramment utilisées depuis plusieurs décennies pour induire une DCE expérimentale, elles semblent mettre en jeu des mécanismes différents. En effet, selon les études, au sein d'une même méthode les résultats peuvent présenter une DCE avec une pharmacologie différente, ou deux méthodes d'induction peuvent montrer des différences de mécanismes.

La DCE induction par **injection de potassium concentré** ou par stimulation électrique brève et répétée partagent une pharmacologie similaire et semblent impliquer le même mécanisme. Les études pharmacologiques montrent une forte dépendance à la libération du glutamate et l'activation des récepteurs NMDA (mais pas AMPA-K), et l'entrée de Ca^{2+} dans les neurones. En effet la DCE est bloquée par application d'antagonistes NMDA (mais pas AMPA-K), dans le cortex comme dans l'hippocampe de rongeur (33), mais aussi sur tranches de néocortex humains (issus de résection chirurgicale comme traitement en cas d'épilepsies réfractaires). La DCE peut aussi être abolie sur tranches corticales par la perfusion d'une solution sans calcium (Ca^{2+} free) ou en bloquant les canaux calciques Cav avec du Cadmium. (34, 35) Cependant, *in vitro* et *in vivo*, des études montrent que l'inactivation des récepteurs NDMA (et/ou des récepteurs AMPA-Kaïnate), si elle réduit la DCE, ne l'abolit pas complètement, mettant en évidence un probable mécanisme différent et indépendant de l'action du glutamate.

Les modèles de souris mutantes apportent de nombreux éléments permettant de confirmer le rôle primordial du glutamate et du Ca^{2+} dans l'induction de la DCE, voire de le préciser. Sur souris mutante MHF 1 donc avec un gain de fonction des canaux $Cav2.1$, il est montré *in vivo* et *ex vivo* une initiation de la DCE facilitée et des niveaux élevés de glutamate (36, 37), mettant en avant l'implication des canaux $Cav2.1$ dans l'influx de Ca^{2+} extracellulaire. Ceci est soutenu par le fait que l'inactivation pharmacologique et spécifique des $Cav2.1$ (toxine ω AgaIVA - ω -agatoxin IVA) bloque l'induction de la DCE, mais pas celle des canaux

Cav2.2 ou 2.3 qui n'a qu'un effet limité et non significatif, ni celle de canaux Cav1.2 qui n'a pas d'effet du tout sur l'induction de la DCE. (38).

L'application prolongée d'une solution concentrée en potassium (longue injection, ou dans le bain de solution), ou de cristaux de KCl sur le cortex, présentent quelques différences mécanistiques avec les applications brèves. En effet, le blocage spécifique des canaux Cav2.1, ou des Cav en général, ou encore la perfusion d'une solution exempte de Ca^{2+} (Ca^{2+} free), n'empêche pas l'induction de la DCE. Par contre, elle semble nécessiter quand même l'activation des récepteurs NMDA, mais pas des AMPA-Kainate. Bien que cela semble nécessaire et démontré, on peut suggérer que, à l'instar de la DCE par injection brève, d'autres mécanismes indépendants de l'activation des récepteurs au Glutamate peuvent intervenir, en mettant en avant le potassium extracellulaire comme facteur clef dans le début de l'induction plutôt que comme acteur passif favorisant l'auto-entretien de la DCE.

Rôle des Astrocytes

Les astrocytes ont de nombreux rôles dans le cortex cérébral, dont celui d'aider à maintenir l'homéostasie extracellulaire, par le biais de pompes de recapture d'ions, de neurotransmetteurs, évitant une excitotoxicité. Ils semblent être aussi impliqués dans l'induction de la DCE. L'étude du modèle génétique de MHF 2 donne des éléments qui vont dans ce sens. Les souris mutantes MHF 2 présentent une perte de fonction du cotransporteur $Na^+K^+ATPase$ qui se traduit par une réduction de son expression dans les astrocytes, et une induction de la DCE facilitée. A ceci est associée une faible clairance du Glutamate et du Potassium (39). La $Na^+K^+ATPase$ est fonctionnellement couplée à des transporteurs du glutamate chargés de le recapturer hors de la fente synaptique. On peut donc suggérer que la facilitation de la DCE dans ce cas, est causée par une perte d'efficacité de clairance par les transporteurs du Glutamate parce que le couplage avec le cotransporteur $Na^+K^+ATPase$ est considérablement perturbé.

DCE et Migraine

Les modèles génétiques de souris de MHF sont un outil légitime pour étudier la DCE, son induction se trouvant facilitée, et les mécanismes de cette facilitation s'y dévoilent peu à peu. Mais quels sont les éléments qui peuvent nous amener à faire l'hypothèse qu'il existe bel et bien un lien entre la DCE et la Migraine ? Ils se trouvent à plusieurs niveaux. Jusqu'à présent, chez l'humain, les liens entre Migraine et DCE ne sont qu'indirectement suggérés,

expérimentalement sur modèles animaux, par imagerie sur l'humain, ou encore par l'effet de traitements pharmacologiques sur la migraine.

DCE et Aura

On peut dire que les premiers éléments en faveur d'une implication de la DCE dans la physiopathologie de la Migraine se trouvent au niveau des phénomènes d'aura migraineuse. En 1941, quelques années avant l'enregistrement de la DCE par Leao, **Lashley** (40) étudie ses propres auras en mesurant la vitesse d'évolution du scotome dans son champ visuel et la détermine aux alentours de 3 mm/min. En 1944, Leao mesure une vitesse de déplacement de la DCE de 3 mm/min. En se basant sur ces deux précédentes observations, **Milner** note en 1958 une potentielle correspondance entre le scotome et la DCE. Enfin en 1981, **Olesen, Larsen et al**, enregistrent les flux sanguins cérébraux (rCBF) chez des patients présentant des migraines avec ou sans aura, pendant une crise de migraine. Ils observent une oligémie (hypo-vascularisation, diminution du calibre des vaisseaux) qui se propage pendant l'aura de migraine, mais pas chez des patients présentant une migraine sans aura.

Bien que la DCE soit visible sur un EEG, ce type d'enregistrement ne peut être utilisé comme outil de diagnostic chez l'humain, car trop peu sensible, et l'utilisation courante de techniques invasives n'est pas envisageable sur des patients migraineux sains.

Chez l'humain l'IRM fonctionnelle BOLD (*blood-oxygen-level dependent*, « dépendant du niveau d'oxygène sanguin ») permet aussi d'enregistrer pendant une période d'aura des modifications cérébrales présentant des caractéristiques similaires à la DCE. Une étude IRMf BOLD sur sujets migraineux et sains, montre dans un premier temps une activation corticale de l'ère occipitale pendant la stimulation visuelle (pour déclencher la migraine), suivie d'une suppression de l'activité chez les sujets présentant des auras et/ou une crise de migraine. Cette activation/suppression se propage lentement à travers le cortex à une vitesse de 3 à 6 mm/minute. (41). Une autre étude sur trois sujets migraineux, montre qu'à l'induction de l'aura et pendant l'évolution du phénomène visuel, une intensification du signal BOLD qui se propage à une vitesse de 3.5 mm/minute, reflétant une vasodilatation ; suivi d'une baisse du signal avec à la fin de l'aura probablement une vasoconstriction consécutive à la vasodilatation (42).

Si l'on pose la DCE comme composant de la pathologie de la Migraine, avec ce phénomène survenant en amont de la crise (aura et déclenchement de la douleur), et que l'on prend en

compte l'état d'hyperexcitabilité corticale observée chez des patients migraineux, il est logique de se demander si diminuer l'excitabilité corticale réduirait la fréquence ou empêcherait les crises.

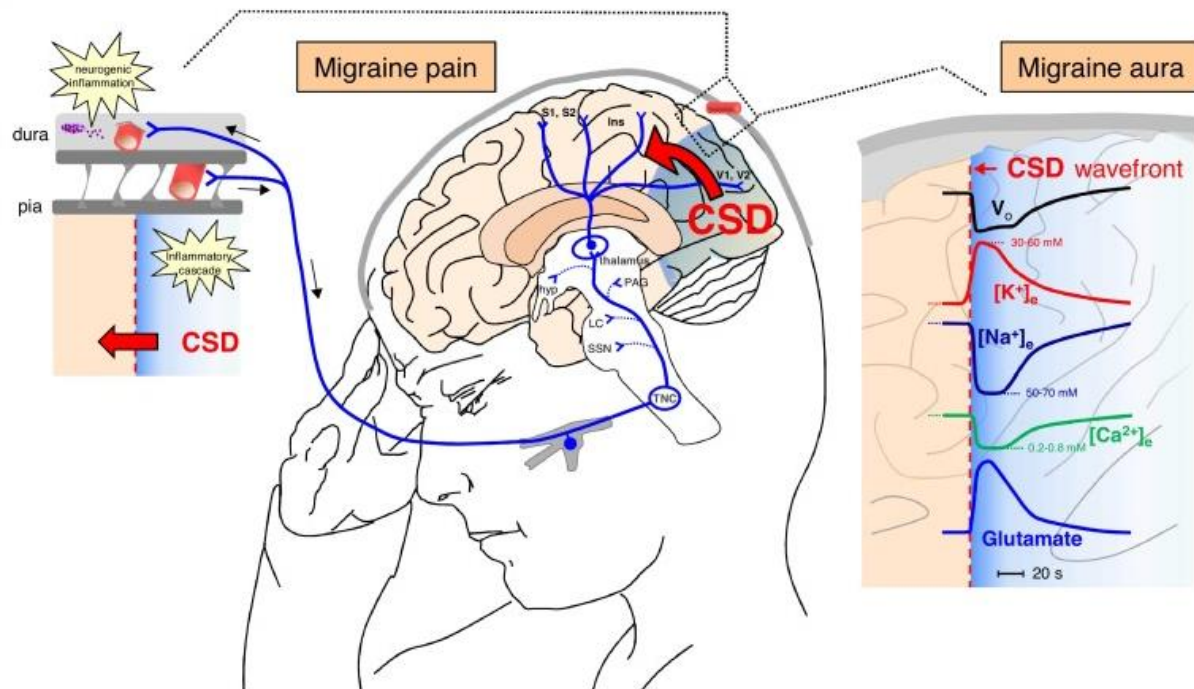
Certains patients migraineux répondant mal ou pas du tout aux traitements classiques de fond de la migraine, peuvent être traités avec des médicaments anticonvulsivants, destinés dans le cas de l'épilepsie à diminuer l'hyperactivité corticale. Le valproate, topiramate et gabapentin, ont montré une certaine efficacité dans la réduction de la fréquence des attaques. La lamotrigine par contre, si elle agit sur les auras, n'empêche pas la céphalée de migraine. (43)

DCE et Voie Trigéminal

Plusieurs études permettent de placer la DCE comme activateur de la voie Trigéminal, qui est à l'origine de la céphalée typique de la migraine.

Récemment, chez le rat il a été montré que la DCE provoque une extravasation dans la dure-mère de neuropeptides vasoactifs (substance P, CGRP) provenant des afférences trigéminales, dénotant une neuro-inflammation. De plus, la DCE active les neurones du TNC (trigeminal nucleus caudalis), caractérisée par l'augmentation de l'expression du facteur c-fos dans le TNC. (44)

Plus récemment encore, il a été montré que la DCE chez le rat provoque une augmentation importante et prolongée (>45 minutes) de l'activité des nocicepteurs méningés, avec un délai entre le passage de la DCE et l'activation, qui peut être mis en parallèle avec les symptômes de la MA où la douleur survient peu après l'aura. Dans une petite proportion de rats, cependant, l'activation des nocicepteurs se fait en même temps que la DCE, ce qui peut aussi correspondre à certains cas de MA rapportés où douleur et aura surviennent simultanément. (figure 15)



Current Opinion in Physiology

Figure 17 Relation entre DCE et déclenchement de la céphalée migraineuse. A droite sont représentées les modifications dans le potentiel extracellulaire (V_0) et des concentrations extracellulaires des ions K^+ , Na^+ et Ca^{2+} , et du glutamate lors de la DCE. La DCE est à la base de l'aura de migraine ; la DCE induit aussi une inflammation neurogénique qui va activer et sensibiliser les afferences trigéminovasculaires des méninges. (de Pietrobon 2018)

Se présente alors le cas du mécanisme à l'origine de la Migraine sans aura, et son lien avec la DCE. On peut suggérer deux hypothèses. Les aura sont rapportées car elles sont expérimentées par les patients et mettent en jeu le système sensoriel, la DCE survenant dans les régions corticales sensorielles concernées. La première possibilité, serait que dans le cas d'une migraine sans aura, la DCE pourrait survenir dans des régions « asymptotiques » ou silencieuses du cortex (45), ne provoquant aucune expérience sensorielle chez les patients, mais déclenchant tout de même la voie TG et donc la céphalée migraineuse. L'autre possibilité serait que la DCE ne survienne pas dans le cas d'une migraine sans aura, et qu'un autre mécanisme d'activation de la voie TG est mis en jeu.

Puisque les crises de migraine diffèrent d'un patient à un autre, ces deux hypothèses peuvent très bien ne pas s'exclure l'une l'autre, mais exister bel et bien toutes les deux, renforçant l'idée de multiples mécanismes à l'origine de la migraine.

INTRODUCTION DU PROJET DE RECHERCHE

1. ROLE DE L'ACTIVATION DU NAV1.1 ET DES NEURONES GABAERGIQUES DANS L'INDUCTION DE LA DCE

Notre équipe s'intéresse à la physiopathologie des canaux sodiques et de l'excitabilité corticale. Comme présentés précédemment, les canaux sodium dépendant du potentiel (Nav), sont essentiels pour l'excitabilité neuronale car ils augmentent de façon transitoire la conductance membranaire en Na^+ en réponse aux dépolarisations, initiant la génération de potentiel d'action. En fait, après la dépolarisation membranaire, ils s'ouvrent (activation) pendant quelques centaines de millisecondes générant un courant entrant et dépolarisant de Na^+ . A des potentiels dépolarisés, ils se convertissent à la vitesse de quelques millisecondes à un état inactivé et non conducteur, à travers un processus nommé Inactivation Rapide. Souvent l'inactivation est incomplète, ayant pour résultat un petit courant inactivateur avec une cinétique de dizaines de secondes, nommé courant persistant.

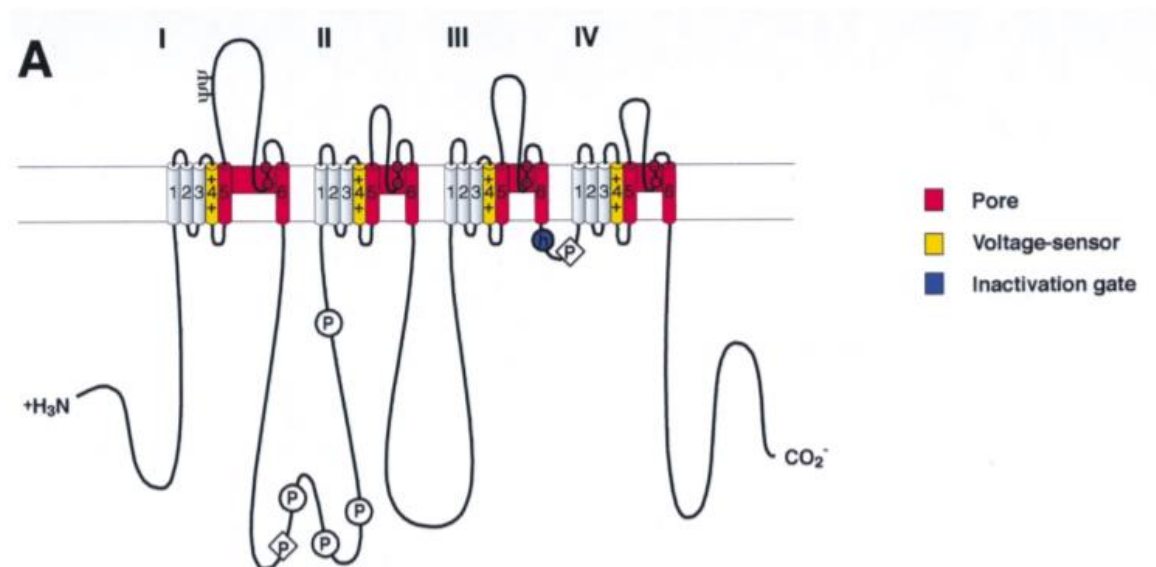


Figure 18 Structures des canaux Nav ; sont colorés les segments dont le rôle dans la fonction du canal a été déterminé : rouge pour la formation du pore, jaune pour la sensibilité au potentiel, bleu pour l'inactivation. (de Cestèle et Caterall, 2000)

Les canaux Nav sont impliqués dans de nombreuses pathologies neurologiques, et le Nav1.1 est la cible majeure de mutations liées à l'épilepsie.

Des **mutations du canal Nav1.1** sont largement étudiées dans notre équipe. Le canal Nav1.1 est majoritairement exprimé dans les neurones GABAergiques où il est nécessaire à la génération des potentiels d'action.

Les mutations pathogènes du gène SCN1A

Les premières mutations pathogènes du gène SCN1A ont été identifiées par Escayg et al (46) : il s'agit de deux mutations faux-sens à l'origine de l'épilepsie génétique avec crises fébriles plus (EGCF+ ou GEFS+ en anglais). Cette pathologie génétique est caractérisée par des crises fébriles (provoquées par une hyperthermie ou une fièvre), qui souvent se poursuivent à l'âge adulte, et par une grande variabilité phénotypique des types d'épilepsies. Le Syndrome de Dravet est une encéphalopathie épileptique sévère caractérisée par des crises fébriles dès le déclenchement de la maladie et avec plus tard le développement d'une résistance aux traitements médicamenteux connus, des déficits cognitifs et comportementaux, une ataxie et une forte mortalité.

Puisque le SD et le GEFS+ présentent toutes les deux des crises fébriles, le gène SCN1A a été séquencé par Claes et al (47) chez des patients SD, et a identifié 7 mutations *de novo*. Six d'entre elles étaient suspectées de générer un canal Nav1.1 tronqué et non fonctionnel, tandis que la septième est une mutation faux-sens avec des conséquences fonctionnelles imprévisibles, à l'instar des mutations GEFS+.

Depuis les premières études, plus de 1000 mutations ont été identifiées dans le gène SCN1A. Elles sont la cause de plus de 80% des cas de SD, et environ 20% des cas de GEFS+ et d'autres phénotypes épileptiques rares. De plus, les variants génétiques de SCN1A apportent des facteurs de risque pour différents types d'épilepsies communes.

Une autre pathologie bien documentée provoquée par des mutations faux-sens de SCN1A est la MHF, une forme rare et sévère de migraine avec aura, caractérisée par une hémiplégie pendant les attaques de migraine. Dans la MHF 3, les crises d'épilepsie sont très rares et ne sont pas liées aux attaques de migraine.

Tout comme les premières mutations décrites, les mutations du Nav1.1 identifiées ensuite dans le SD sont soit des mutations faux-sens (pour environ pour un 1/3), avec des effets fonctionnels difficiles à prédire, ou des troncation/délétion qui sont prévues de donner lieu à des canaux non fonctionnels (environ 2/3). En revanche, les mutations GEFS+ et MHF du SCN1A sont toutes des mutations faux-sens. L'identification des mutants épileptogènes Nav tronqués, non fonctionnels, était au départ perturbant, car le Nav1.1 était suspecté de

s'exprimer dans les neurones excitateurs et ses mutations perte de fonction n'étaient pas cohérentes avec l'hyperexcitabilité neuronale, qui est suspectée de donner lieu aux crises d'épilepsie.

Ces découvertes déconcertantes soulignent l'importance des études fonctionnelles pour l'identification des mécanismes pathologiques, qui sont toujours essentielles. En fait, bien qu'il y ait eu des progrès dans le développement d'algorithmes pour les prédictions *in silico* des effets des mutations, en général basées sur la conservation des propriétés physico-chimiques des protéines et des séquences aminoacides dans et à travers les espèces, ils ne révèlent pas de manière fiable l'effet détaillé des fonctions de la protéine et ne sont pas des outils de prédiction des effets globaux sur les phénotypes.

Effets fonctionnels sur les propriétés d'excitabilité du canal et des neurones, étudiées dans les systèmes d'expression

Les études qui visaient à découvrir les effets fonctionnels des mutations SCN1A, en particulier les mutations faux-sens, ont initialement été entreprises sur des systèmes d'expression hétérologues sur cellules en culture qui n'expriment pas la protéine d'intérêt, et dans lesquels l'ADNc (clone ADN) d'intérêt est inséré/transfecté.

Ce sont en général des cellules embryonnaires humaines de rein (HEK) ou la lignée dérivée tsA-201, qui permet des screening relativement rapides des mutants, mais ils ne fournissent pas un fond cellulaire neuronal et de forment pas de circuits neuronaux pour étudier les effets sur l'activité de réseau.

Il est important de souligner que les mutations doivent être introduites dans l'ADNc humain de l'isoforme dans lequel la mutation a été identifiée, car les mêmes mutations peuvent avoir des effets fonctionnels différents dans les séquences paralogues ou orthologues. Cependant, l'utilisation d'ADNc humain du Nav1.1 a été un challenge technique à cause de son instabilité qui mène à des réarrangements de séquences quand il est traité avec des techniques de biologie moléculaire standard.

En effet, bien que sa séquence ait été identifiée en 1986, il a été re-cloné et exprimé avec succès pour la première fois seulement 16 ans plus tard, dans une étude visant à identifier les effets fonctionnels de trois mutations GEFS+. SCN1A subit un épissage alternatif à l'exon 11, qui produit des variants avec des délétions de 33 paires de base (11 aa) et 84 paires de base (28 aa) dans la boucle intracellulaire entre le domaine 1 et 2 ; le variant plus court de

33 pb est le variant épissé prédominant le plus exprimé dans le cerveau. Les variants complets et -33 pb ont été utilisés pour des études fonctionnelles dans des systèmes d'expression.

Mutations Epileptogènes

Dans la première étude fonctionnelle avec l'ADNc humain, Lossin et al (48), ont utilisé la séquence complète du Nav1.1. Ils ont observé une inactivation perturbée avec pour résultat un courant persistant augmenté pour les mutants GEFS+, un effet gain de fonction consistant avec une excitabilité neuronale augmentée, mais opposé à l'effet prédit des mutations troncation du SD.

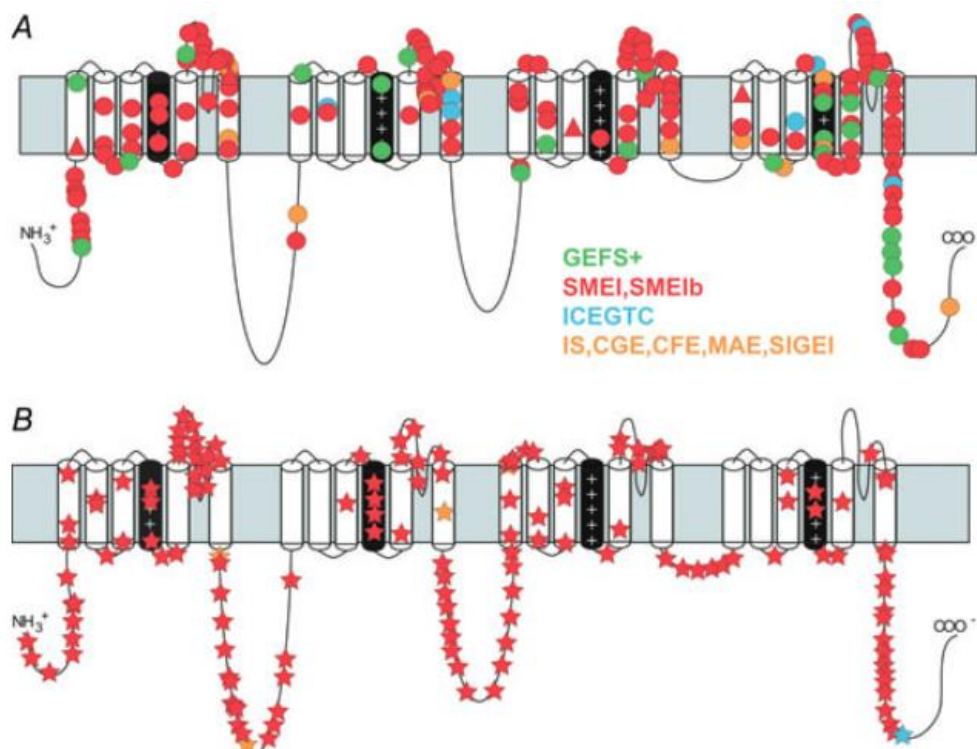


Figure 1. Mutations in Nav1.1 channel patients with epilepsy

A, missense mutations (circles) and in-frame deletions (triangles). B, truncation mutations (stars). The clinical type of epilepsy is indicated by colour: GEFS+, generalized epilepsy with febrile seizures plus; SMEI, severe myoclonic epilepsy of infancy; SMEIb, borderline SMEI; ICEGTC, idiopathic childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures; IS, infantile spasms; CGE, cryptogenic generalized epilepsy; CFE, cryptogenic focal epilepsy; MAE, myoclonic astatic epilepsy; SIGEI, severe idiopathic generalized epilepsy of infancy. Courtesy of M. Meisler and J. Kearney (Catterall *et al.* 2008).

Figure 19 Mutations du Nav1.1 identifiées chez des patients épileptiques. En A sont indiquées la localisation des mutations faux sens (ronds et triangles), et en B les mutations donnant une protéine tronquée (étoiles).

Cependant, un papier complémentaire a rapporté des pertes de fonction pour d'autres mutations GEFS+, et dans certains cas une perte totale de fonction, comme pour une mutation faux-sens de SD qui a été étudiée en parallèle. Les études fonctionnelles réalisées par la suite ont confirmé que la perte de fonction est l'effet principal des mutations Nav1.1 des SD et GEFS+, bien que pour certaines mutations il a été observé des effets mixtes gain de fonction/perte de fonction mais aussi un net gain de fonction pour quelques mutations.

Ces incohérences peuvent être générées par les conditions expérimentales : le fond cellulaire, le variant épissé d'ADNc, etc. Par exemple, les enregistrements de neurones néocorticaux dissociés issus de souris transgéniques exprimant le mutant Nav1.1 GEFS+ R1648H, qui est caractérisé par un gain de fonction dans certains systèmes d'expression hétérologues, ont montré qu'elle induit plutôt une perte de fonction dans un fond cellulaire neuronal, avec des modifications des propriétés du canal qui dépendent du sous-type neuronal. Un autre exemple est une étude rapportant deux mutants présentant un gain de fonction à température ambiante présentent à la place une perte de fonction à plus hautes températures.

Le spectre de sévérité des épilepsies liées au Nav_v1.1, pourrait être une continuité et dépend de la quantité de perte de fonction du mutant : une perturbation légère des fonctions du Nav_v1.1 causerait des phénotypes légers, tandis que des pertes de fonction complètes causeraient des phénotypes sévères. De façon intéressante, certaines mutations faux-sens Nav_v1.1 provoquent une perte de fonction à cause des défauts de repliement et de trafic qui conduisent à la dégradation du canal dans les compartiments intracellulaires. Ces mutants peuvent souvent être restaurés par des protéines d'interaction qui stabiliseraient probablement la conformation correcte de repliement. Des interactions similaires peuvent restaurer les mutants *in vivo*, régulant la quantité de perte de fonction et moduler de ce fait le phénotype.

Possible, les pertes de fonction complètes observées dans certains mutants GEFS+ peuvent être causées par un manque de restauration dans les conditions expérimentales utilisées et, inversement, un manque de restauration *in vivo* pourrait induire une perte de fonction complète des mutants SD qui montrent une légère perte de fonction dans certains systèmes d'expression.

Notamment, les mutants faux-sens Nav_v1.1 avec défaut de repliement peuvent aussi être partiellement restaurés par des interactions avec de petites drogues ou des peptides modifiés, qui se lient à eux dans le réticulum endoplasmique et stabilisent probablement la

conformation correcte de repliement, de façon similaire aux protéines d'interaction ; cette approche peut être utilisée pour développer des thérapies.

Mutation MHF 3

Les études fonctionnelles des mutations MHF 3 ont initialement généré des incohérences similaires. La première étude a été faite en réalisant la mutation identifiée sur l'ADNc du Nav1.5, l'isoforme cardiaque, sur lequel il a été observé un léger effet de gain de fonction. La même mutation a été étudiée avec le variant épissé long dans les lignées cellulaires, avec des effets mitigés sur les propriétés de portillonnage (gating) qui ont induit une perte de fonction globale. Dans le même temps, dans une étude qui a utilisé le variant épissé Nav1.1 humain (-11 aa) exprimé à la fois dans les lignées cellulaires et dans les neurones en culture, il a été observé de nombreux effets mitigés qui induisent un grand gain de fonction global, conduisant à une hyperexcitabilité des neurones en culture.

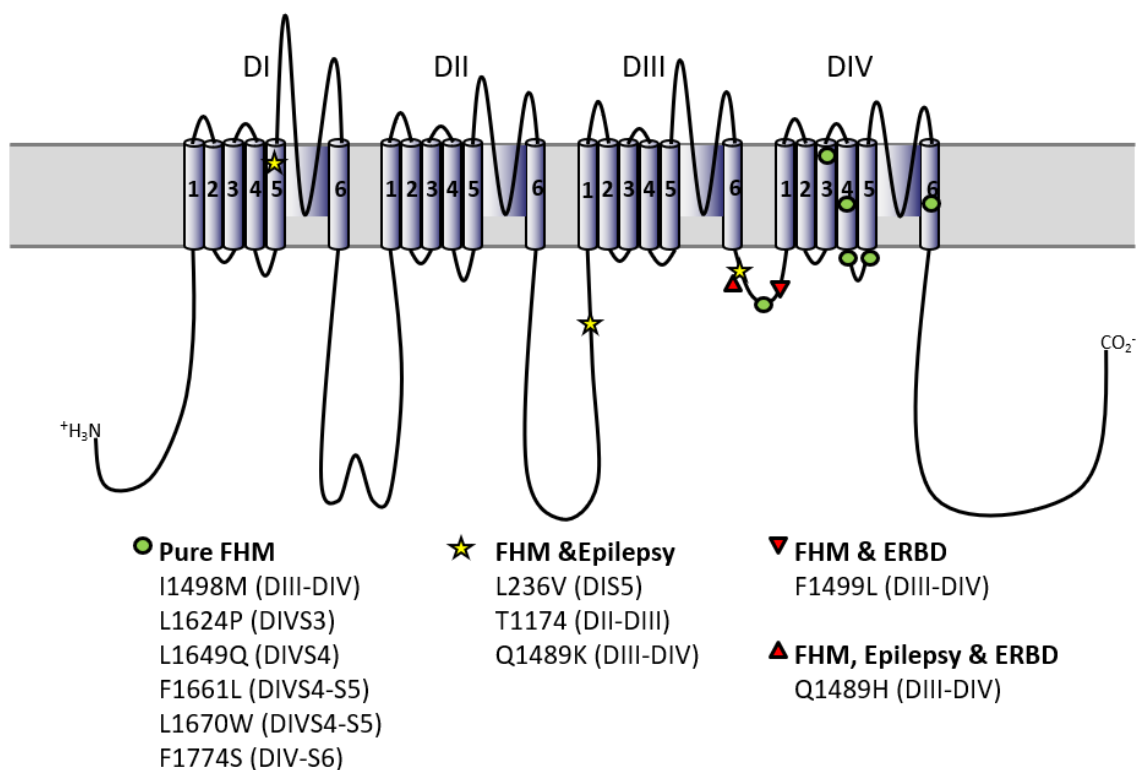


Figure 20 Localisation des mutations MHF 3 dans le canal Nav1.1 (modifié depuis Dhifallah et al, 2018) (49)

De façon intéressante, une autre mutation MHF a montré une perte de fonction presque complète dans une étude, un effet déconcertant qui aurait pu être cohérent avec un phénotype épileptique sévère, mais une autre étude a montré que la perte de fonction était causée par des défauts de repliement et de trafic et que l'expression du mutant pouvait être

restaurée par interaction avec des protéines où l'expression dans des fonds cellulaires neuronaux.

De façon remarquable, quand le mutant est partiellement restauré, il présente un grand gain de fonction à cause des nombreuses modifications des protéines fonctionnelles, qui induisent une hyperexcitabilité dans les neurones transfectés. Notamment, quand cette mutation a été étudiée dans le canal cardiaque Nav1.5, elle ne provoquait pas de défaut de repliement et induisait de légères modifications des propriétés fonctionnelles qui sont cohérentes avec un gain de fonction.

D'autres rapports ont à présent confirmé que les mutations MHF provoquent un gain de fonction du Nav1.1. Un de ces rapports a identifié une autre mutation MHF avec défaut de repliement pour laquelle la restauration induite par expression dans neurones a changé l'effet fonctionnel d'une complète perte de fonction à un large gain de fonction à cause des modifications des propriétés de gating.

Ainsi, ceci pourrait être un mécanisme récurrent dans la MHF 3. Notamment, une modification récurrente des propriétés de gating induite par les mutations MHF 3 et l'augmentation du courant persistant. Le gain de fonction du Nav1.1 induit par les mutations MHF 3 peut faciliter l'initiation et la propagation de la DCE, mais cette hypothèse n'a pas encore été testée sur modèles animaux.

Globalement, ces résultats montrent que les mutations épiléptogènes provoquent un degré variable de perte de fonction tandis que les mutations migraine provoquent un gain de fonction, qui parfois peuvent apparaître comme perte de fonction dans les études fonctionnelles à cause des défauts de repliement/trafic restaurables. Elles mettent en lumière aussi l'importance du variant d'ADNc et du système d'expression dans l'établissement des propriétés fonctionnelles des mutants Nav1.1.

L'hypothèse formulée était que le gain de fonction du canal, augmenterait l'excitabilité des neurones où s'expriment le Nav1.1, et donc la libération de potassium dans le milieu extracellulaire, et/ou de glutamate, avec pour résultat une hyperactivation du réseau cortical et une facilitation du déclenchement de la DCE comme cela a été observé dans les modèles génétiques de souris de MHF 1 et 2.

Cependant, l'expression majoritaire du canal Nav1.1 se trouve dans les neurones inhibiteurs GABAergiques. **Alors comment une hyperactivation du canal Nav1.1 entraînant une hyperexcitabilité des neurones GABAergiques, pourrait provoquer une**

hyperexcitabilité corticale ? En effet, ceux-ci libèrent le neurotransmetteur GABA dans la synapse qui active les récepteurs GABA sur les neurones cibles, entraînant leur hyperpolarisation. Ils sont donc classiquement perçus comme des cellules inhibitrices, diminuant l'activité d'un réseau neuronal.

Cependant, de récents travaux décrivent une activité des interneurons favorisant le déclenchement d'activités excitatrices au sein d'un réseau neuronal, dans un contexte physiopathologique. Deux études, utilisant l'optogénétique sur tranches de cerveau, montrent en effet que l'activation sélective d'interneurones peut induire des activités de type épileptique (50, 51). Par ailleurs, dans un contexte physiologique, les interneurons interviennent dans la synchronisation de réseaux neuronaux. Ainsi, par exemple, Schlingloff et collaborateurs ont récemment montré leur implication dans le déclenchement d'activités physiologiques hippocampiques soutenues par un réseau neuronal excitateur (52). Le rôle des interneurons est complexe et ne se limite donc pas qu'à une fonction d'inhibition.

Puisque la Migraine et la MHF sont associées à une hyperexcitabilité corticale, et que la DCE est largement exploitée dans ce contexte, nous avons donc décidé d'étudier l'implication des Nav1.1 et des neurones GABAergiques dans la génération de la DCE.

L'**hypothèse de travail** est la suivante :

Puisque la mutation Nav1.1 MHF type 3 entraîne un gain de fonction et expérimentalement une hyperexcitabilité des neurones transfectés avec le canal muté, il serait donc possible d'induire une DCE en hyperactivant le canal Nav1.1 ou les neurones GABAergiques ; et si tel est le cas, par quel mécanisme ?

Approche Expérimentale

Pour éprouver cette hypothèse j'ai utilisé deux approches expérimentales de stimulation, sur tranches de cerveau de souris adulte : une toxine activatrice et spécifique du Nav1.1 et l'optogénétique pour activer sélectivement les neurones GABAergiques.

Approche Pharmacologique

Pharmacologie du Nav1.1

Les canaux sodiques Nav sont la cible moléculaire de nombreuses toxines qui sont capables d'altérer considérablement la fonction du canal, en se fixant sur des sites récepteurs

spécifiques. De ce fait ces toxines représentent un outil puissant d'étude de leur structure et de leur fonction, en modulant soit la perméabilité aux ions, soit les propriétés de gating.

Les mécanismes d'action moléculaires des neurotoxines sur les canaux sodiques, peuvent être divisés en trois classes : le blocage de pore, la modulation allostérique indirecte du gating, et la capture du senseur de voltage.

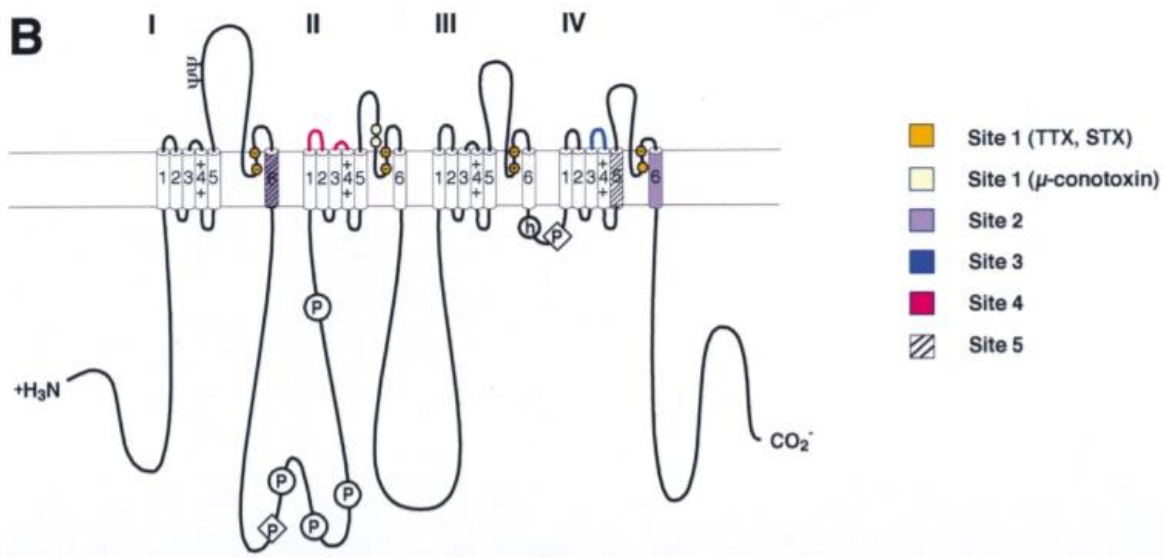


Figure 21 Localisation des sites d'action des toxines sur les canaux Nav (Cestèle et Caterall, 2000) (53)

La Tétrôdotoxine (TTX) et la Saxitoxine (STX) sont des exemples classiques de toxines bloquant les pores, agissant par interaction avec le site 1 du récepteur aux neurotoxines dans les canaux sodiques. Les résidus aminoacides dans les boucles membranaires réentrantes qui forment l'ouverture extérieure du pore sont aussi les principaux composants du site récepteur de la toxine. Ainsi, TTX, STX et les μ -conotoxines sont des bloqueurs directs qui obturent l'entrée extracellulaire du pore du canal sodique.

Les toxines qui agissent au niveau des sites 2 et 5 des récepteurs à neurotoxines dans les canaux sodiques, sont des modulateurs allostériques de la fonction du canal. Ils se lient à des sites qui sont distincts du pore ou des senseurs de voltage et favorisent l'état ouvert du canal sodique par des interactions indirectes et allostériques. Lorsqu'elles sont liées, ces toxines altèrent les interactions des segments transmembranaires dans les domaines homologues ainsi que les domaines homologues adjacents, ayant pour résultat une altération de l'activation dépendant du voltage, son couplage à l'inactivation et dans certains cas aussi la perméabilité aux ions.

Les senseurs de potentiel responsables de l'activation des canaux sodiques et leur couplage à l'inactivation sont des segments transmembranaires, inaccessibles à la liaison avec des toxines polypeptidiques hydrophiles. Ces toxines ont évolué pour lier la boucle S3-S4 aux terminaisons extracellulaires des segments S4 des canaux sodique. et altèrent leurs mouvements transmembranaires, qui sont requis dans le processus de gating. Ainsi les toxines alpha-scorpion et les toxines d'anémones de mer bloquent de façon spécifique l'inactivation en suspendant le segment transmembranaire du domaine 4 dans sa position sortante, tandis que les toxines beta-scorpion augmentent spécifiquement l'activation des canaux sodiques en maintenant le segment S4 du domaine 2 dans sa position sortante. Toutes ces toxines altèrent directement les mouvements du senseur de potentiel et ainsi ont des effets assez spécifiques sur la fonction du canal.

En fait, ce mécanisme de capture du senseur de voltage peut être la base moléculaire des actions de toutes les toxines polypeptidiques qui modifient la dépendance au potentiel du gating des canaux sodiques.

Par exemple, les hanatoxines de la tarentule se lient à la boucle S3-S4 des canaux potassiques et inhibent l'activation du canal en déplaçant la dépendance au potentiel de l'activation vers des potentiels de membrane plus positifs.

Choix de la Toxine

Heteroscodratoxin-1 (plus connue en tant que Hm1a ou HmTx1) est une neurotoxine peptidique retrouvée dans le venin de l'araignée *Heteroscodra maculata*. A l'origine étudiée pour ses propriétés d'inactivation spécifiques des canaux potassiques dépendant du potentiel Kv2 et Kv4 (54), et aussi à présent utilisée pour activer les canaux Nav (55, 56). A faibles concentrations (100 nM) la toxine n'a qu'un effet très limité sur les canaux Kv2 et Kv4 (54), et commence à être sélective aux clones humains des canaux Nav1.1 et 1.2 (55) exprimés dans des systèmes hétérologues et dans des ovocytes de xénope. Nos propres études ont montré une spécificité de la toxine au Nav1.1 à de faibles concentrations, soit 10 nM, avec un effet sur les propriétés du canal similaire à celui des mutations MHF 3 sur des neurones immatures issus de cultures primaires. Nous pouvons donc utiliser cette toxine Hm1a pour activer spécifiquement les canaux Nav1.1. Si la toxine avait un effet sur le Nav1.2, cela resterait négligeable car, travaillant sur souris adulte, le canal n'est que faiblement exprimé dans les neurones excitateurs.

Récemment, une étude réalisée sur le modèle de souris de Syndrome de Dravet a montré l'efficacité de la toxine Hm1a dans l'amélioration du phénotype épileptique par un

traitement avec la toxine, en se focalisant sur l'hippocampe chez des souris jeunes (P14-P18). De façon surprenante, Richards et al (2018) (56) n'observent aucun effet activateur de la toxine dans les neurones inhibiteurs hippocampiques sur les souris *wild-type*. Ces résultats sont surprenants et vont à l'encontre de notre hypothèse selon laquelle l'activation du Nav1.1 entrainerait une hyperexcitabilité des neurones GABAergiques. Cependant cette étude se focalise sur l'hippocampe et les phénomènes épileptiques, pas sur le cortex et les phénotypes liés à la migraine. Nos expériences avec la toxine Hm1a devraient nous permettre de mieux comprendre pourquoi aucun effet n'a été observé dans cette étude.

Ce travail sera réalisé sur des tranches de cerveau de souris *wild-type*, et selon notre hypothèse de travail, le traitement des tranches avec la toxine activerait le canal Nav1.1 de façon à ce que les neurones inhibiteurs GABAergiques voient leur excitabilité augmentée. Par un mécanisme qui serait à découvrir, l'hyperexcitabilité des neurones GABAergiques entrainera une hyperexcitabilité générale de tout le réseau néocortical, à l'origine de l'induction de la DCE.

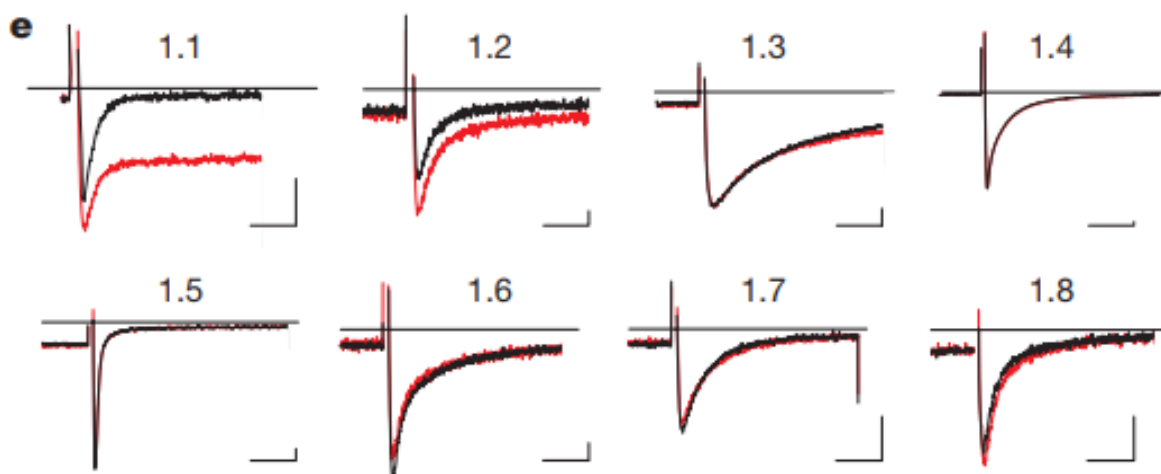


Figure 22 Effets de la toxine sur les propriétés biophysiques des canaux Nav 1.1 à 1.8 sur ovocytes de Xénope transfectés. Hm1a provoque un gain de fonction du canal Nav1.1 qui se traduit par l'existence d'un courant persistant (Osteen et al, 2016)

Optogénétique

A un niveau cellulaire, pour activer uniquement les neurones GABAergiques, nous avons utilisé l'optogénétique. L'optogénétique est un outil utilisé en neurosciences, élue Méthode de l'Année 2010 par Nature Methods. Elle permet d'activer spécifiquement une sous-

population de neurones. Cette technique fait intervenir l'utilisation de protéines photosensibles extraites d'organismes microbiens.

La première protéine photosensible identifiée est la pompe à protons BactéioRhodopsine (BR). Dans des conditions pauvres en oxygène, la BR est fortement exprimée dans la membrane des halobactéries et sert de système alternatif de production d'énergie, en pompant les protons depuis le cytoplasme vers le milieu extracellulaire pour générer une force motrice qui va conduire à la synthèse d'ATP.

Une seconde classe de gènes d'opsines microbiennes code pour des HaloRhodopsines (HR). La HR est une pompe chlore photo-activable qui a d'abord été découverte dans des archéobactéries. Le principe de la HR est similaire à celui de la BR, les seules différences résident dans le fait qu'elle pompe du chlore et dans la direction du transport qui se fait du milieu extracellulaire vers l'espace intracellulaire.

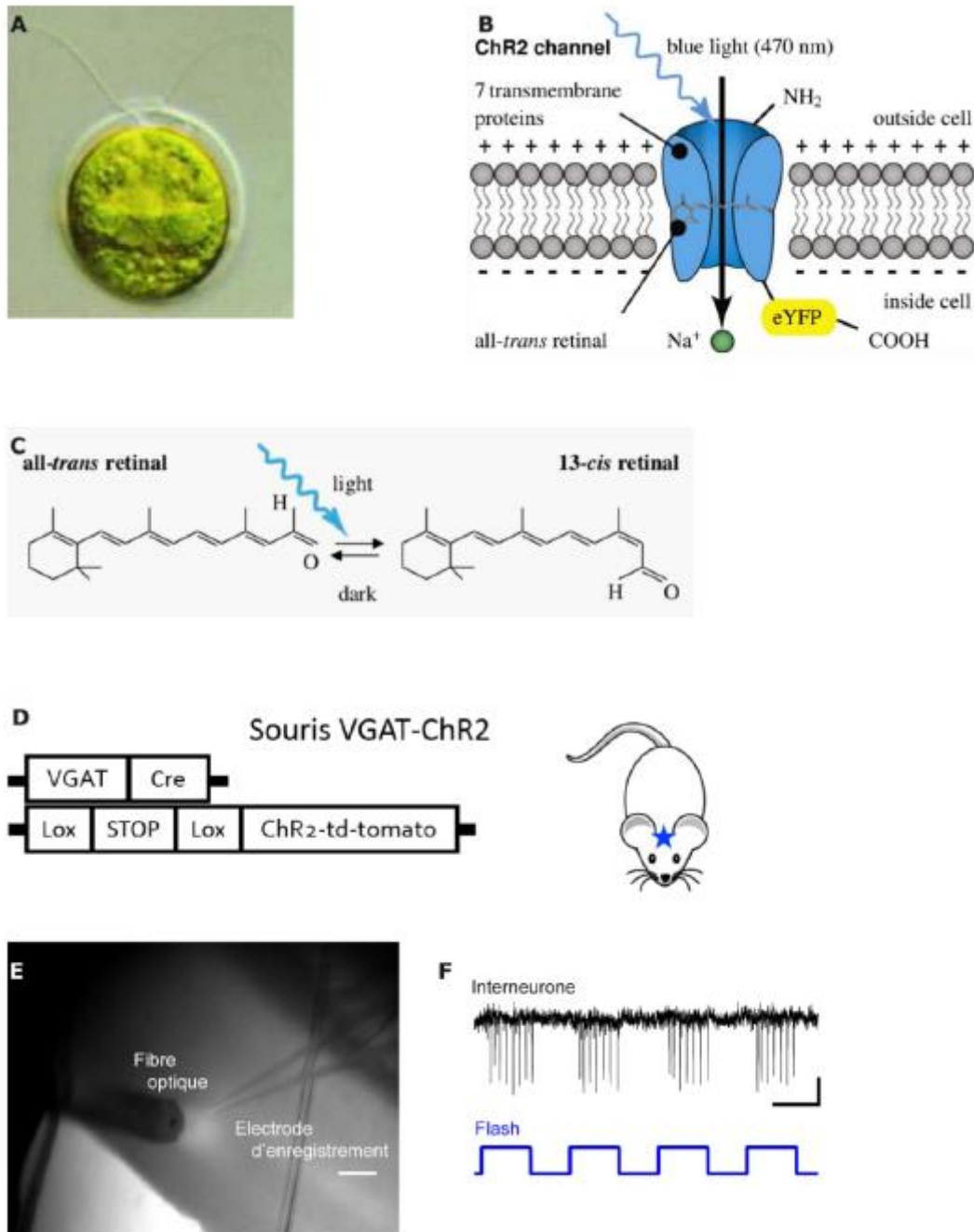


Figure 23 Outil optogénétique. L'optogénétique fait intervenir l'utilisation de protéines photosensibles extraites d'organismes microbiens, exprimées uniquement dans les interneurons de lignées transgéniques de souris afin d'activer de façon spécifique avec une lumière bleue (470nm). A) *Chlamydomonas reinhardtii*, algue microbienne. B) La Channelrhodopsine (ChR2) est une protéine-canal perméable aux cations. C) Structure du rétinale du canal ChR2 ; l'absorption de photons fait passer le rétinale à une conformation isomérisée. D) Les expériences de cette étude en optogénétique sont réalisées sur des souris issues d'un croisement de deux lignées transgéniques. L'utilisation du système Cre-Lox, permet l'expression conditionnelle de canal ChR2 uniquement dans les interneurons, grâce à un promoteur spécifique de cette sous-population neuronale. E- F) Enregistrement extracellulaire d'un interneurone exprimant le canal ChR2 dans la souris « VGAT-ChR2 » par l'illumination locale via une fibre optique (source lumineuse 470 nm). A chaque illumination (« Flash »), l'interneurone se dépolarise et décharge des potentiels d'action.

Pour cette étude nous avons utilisé la **Channelrhodopsine**, une protéine-canal perméable aux cations, et extraite d'une algue (*Chlamydomonas reinhardtii*), activée à une longueur d'onde de 470 nm. Chez cet organisme elle contrôle la phototaxie, un déplacement vers la lumière, favorable à la photosynthèse. La Channelrhodopsine possède un rétinol, une des formes de la vitamine A, capable d'absorber la lumière. Non illuminé, le rétinol se présente sous une conformation inactive, le canal ChR2 est fermé. Illuminé, il y a absorption de photons, le rétinol change de conformation, et s'en suit une série de réactions photochimiques et structurales, aboutissant à l'ouverture du canal et le passage de cations (57) Exprimée dans un neurone, la Channelrhodopsine est inactive lorsqu'elle n'est pas illuminée. La protéine-canal s'ouvre sous l'influence de la lumière, entraînant une dépolarisation de la cellule nerveuse, qui conduit ultimement à la génération de potentiels d'actions.

Récemment, deux études montrent qu'il est possible d'induire directement une DCE par optogénétique sur souris anesthésiée ou vigile, en activant les neurones où l'expression de la ChR2 est dirigée par le promoteur **Thy1**, qui s'exprime largement dans les cellules neuronales. La photo-stimulation transcrânienne induit une modification du profil électrophysiologique (enregistrement extracellulaire) similaire à celle d'une DCE induite par injection de KCl, avec perturbation des fonctions motrices et du comportement chez la souris vigile (58, 59).

Le but était donc de se servir d'une lignée de souris transgéniques exprimant la ChR2 uniquement dans les neurones GABAergiques, (cf. Matériel et Méthodes) afin d'activer massivement ces neurones GABAergiques inhibiteurs, générer une hyperexcitabilité du réseau neuronal dans le néocortex et induire une DCE.

2. MODULATION MUSCARINIQUE DE LA DEPRESSION CORTICALE ENVAHISSANTE

La migraine est un désordre complexe et un problème d'excitabilité du réseau cortical est un mécanisme pathologique possible, causé par une perturbation de la balance excitation-inhibition menant à une hyperexcitabilité neuronale.

Dans le cerveau physiologique, les oscillations sont impliquées dans un panel de fonctions, de la cognition à la motricité. Chez les mammifères, parmi les oscillations les plus étudiées, celles observées durant la phase de sommeil lent (non-REM sleep) ont la particularité de présenter une alternance d'état HAUT et BAS (UP/DOWN state) à un rythme lent compris entre 0,2 et 1 Hz, et où l'état HAUT est caractérisé par la présence rythmique d'activité synaptique et de décharges de potentiels d'action. En l'absence d'entrée sensorielle, le cerveau présente une activité spontanée, L'UP/DOWN State en fait partie (figure 19).

L'UP/DOWN state a été souvent étudié chez des animaux anesthésiés par uréthane ou d'autres anesthésiques qui induisent des oscillations lentes dans le cortex similaires à celles qui sont observées pendant le sommeil ou l'anesthésie. Cet état se réfère à un ensemble de propriétés cellulaires et de réseau qui entraînent les neurones à répondre aux entrées synaptiques en deux étapes. La plupart des travaux sur l'UP/DOWN state est réalisé sur des coupes de tissus. Les neurones peuvent présenter un comportement (binaire) à cause de leurs propriétés intrinsèques ou parce qu'ils sont au sein d'un réseau qui le leur impose, ou les deux.

Si l'origine de ce phénomène n'est pas encore connue de façon précise, les transitions entre UP et DOWN sont attribuées aux propriétés intrinsèques du réseau. Les transitions sont pratiquement abolies par des bloqueurs pharmacologiques comme les antagonistes aux récepteurs au glutamate, et totalement abolies par le traitement simultané d'antagonistes des récepteurs au glutamate et au GABA. Chez le chat anesthésié, la durée de l'UP/DOWN state est réduite de façon drastique par des antagonistes mAChRs (récepteurs muscariniques à l'acétylcholine), suggérant un rôle du système cholinergique dans la génération de la phase UP.

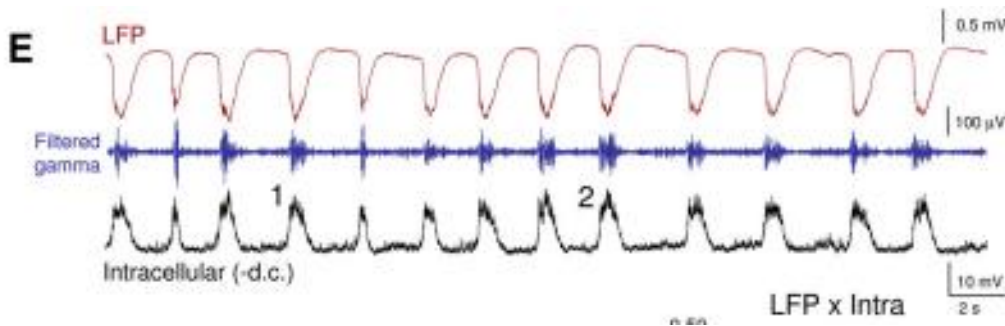


Figure 24 Enregistrements d'états UP/DOWN dans la couche V du cortex auditif sur tranches de cerveau traitées avec du carbachol ; en rouge un enregistrement en potentiel de champ, en bleu le signal filtré, en noir un enregistrement intracellulaire (depuis Lörincz et al, 2015)

L'Ach est synthétisée à partir de la choline et d'acétylCoA. La choline est pompée activement dans le milieu par les terminaisons axonales, tandis que l'acétylCoA provient de la dégradation du glucose dans les mitochondries. Cette synthèse est catalysée par la choline transférase, elle-même synthétisée dans le corps cellulaire et véhiculée jusqu'au niveau des terminaisons synaptiques par le flux axonal antérograde. Le neuromédiateur est ensuite stocké au niveau des vésicules pré synaptiques par un système de transport actif.

On distingue deux types principaux de récepteurs cholinergiques différents, selon la nature des substances agonistes : les récepteurs nicotiques, activés par la nicotine et les récepteurs muscariniques stimulés par la muscarine (figure 20).

Les **récepteurs nicotiques** à l'acétylcholine sont actuellement parmi les récepteurs de NM les plus connus. Ce sont des protéines canaux dont l'ouverture est contrôlée par la présence d'Ach et qui sont spécifique aux cations. Ces récepteurs sont constitués de 5 sous unités protéiques formant une structure en tube d'un poids moléculaire total d'environ 300kDa. Chaque protéine possède 2 sous unités alpha identiques, susceptibles de se combiner avec l'Ach au niveau de sites spécifiques localisés sur une région de la protéine tournée vers le compartiment extracellulaire. Leur ouverture entraîne donc une dépolarisation importante de la membrane. L'ouverture de la protéine canal laissant le libre passage aux cations, nécessite la fixation de deux molécules d'Ach sur les deux sites de combinaisons des sous-unités alpha.

Les différentes sous unités possèdent chacune quatre domaines hydrophobes qui traversent la membrane. Ces quatre types de sous unités possèdent un nombre important de séquences d'acides aminés homologues, ce qui fait penser qu'elles proviennent d'une même protéine ancestrale.

Ces canaux présentent un phénomène de désensibilisation. En effet lors d'une application continue d'Ach, les courants cationiques au travers de ces protéines diminuent progressivement malgré la fixation d'Ach sur les deux sous unités. Bien que les récepteurs soient localisés dans la fibre musculaire et dans le système nerveux central, ils semblent constitués d'unités protéiques différentes.

Les récepteurs muscariniques possèdent une structure totalement différente des récepteurs nicotiques. Ils sont en particulier constitués d'un seul type de sous unité d'un poids moléculaire de 51 kDa, un récepteur étant probablement constitué de plusieurs sous unités. Contrairement aux sous unités du récepteur nicotinique, la sous unité constitutive des récepteurs muscariniques comprend 7 domaines hydrophobes.

Ces deux types de récepteurs n'ont donc pas de propriétés communes si ce n'est de pouvoir fixer la même molécule. En réalité, ces deux types de récepteurs correspondent à deux familles de récepteurs différents caractérisés par leurs mécanismes de transduction du signal.

La première correspond aux récepteurs associés à un canal ionique, et pour lesquels on peut citer les récepteurs nicotiques à l'Ach, le Récepteur GABA_A et le récepteur à la glycine.

La seconde correspond à des récepteurs couplés à des protéines G membranaires, pour lesquels on peut prendre comme exemple le récepteur muscarinique ou les récepteurs alpha et beta adrénergiques.

Certains récepteurs muscariniques sont liés à des protéine G qui activent à leur tour des canaux ioniques sans intervention d'un second messager intracellulaire. D'autres récepteurs muscariniques agissent par l'intermédiaire de l'AMPc.

Ces deux types différents de récepteurs sont en général localisés, soit au niveau d'une même synapse (synapses entre fibre pré et post ganglionnaires du système nerveux végétatif) soit plus généralement au niveau de synapses différentes.

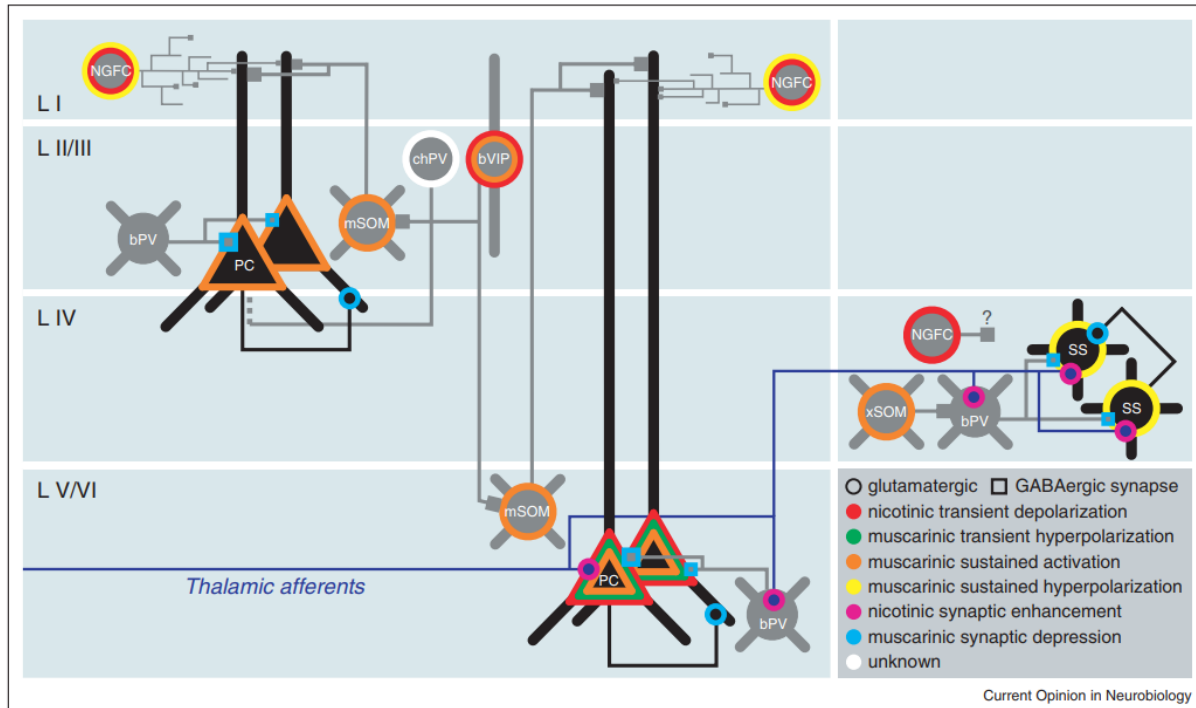


Figure 25 Actions des afférences nicotiques et muscariniques sur les neurones et les synapses du néocortex. Chaque couleur correspond à un type d'action distinct listé dans l'encart en bas à droite.

Puisque nous avons présenté plus haut que les UP/DOWN states peuvent être régulés via les mAChRs, nous allons nous focaliser plus particulièrement dessus. Les mAChR jouent un rôle dominant dans la transmission des actions de l'Ach dans le cerveau, et produisent indirectement à la fois excitation et inhibition à travers la fixation à une famille unique de sous type de récepteurs. Les mAChR sont retrouvés à la fois au niveau pré et post synaptique, et leurs effets neuronaux principaux semblent être transmis par des altérations dans les propriétés des canaux ioniques. Les mAChR présynaptiques participent à des boucles importantes de feedback qui régulent la libération d'Ach. L'Ach libéré par les terminaisons pré synaptiques peut se lier aux mAChR de la même terminaison nerveuse, ainsi activer les processus enzymatiques qui modulent la libération ultérieure de NT. Cette modulation est typiquement une inhibition ; cependant l'activation du mAChR 5 produit une augmentation de la libération. Ces autorécepteurs sont un mécanisme de régulation important pour la modulation à court terme (ms à sec) de la libération de NT.

La famille des mAChR inclut actuellement 5 membres (m1 à m5), allant de 55 à 70 kDa, et chacun de ces 5 sous type présente une architecture typique de 7 domaines transmembranaires. La plupart de cette diversité dans cette famille de récepteurs réside dans la troisième boucle intracellulaire (i3) responsable du couplage spécifique aux protéines G. Les mAChRs 1, 3, et 5 se couplent de façon prédominante aux protéines G qui

activent l'enzyme phospholipase C. Les mAChRs 2 et 4 se couplent aux protéines G qui régulent directement les canaux K⁺ et Ca²⁺. Comme c'est le cas pour d'autres GPCRs, le domaine proche de la région N-ter de i3 est important pour la spécificité du couplage à la protéine G. Ce domaine est conservé dans m1, m3 et m5, mais il est unique dans m2 et m4. Plusieurs autres résidus importants ont aussi été identifiés couplant les protéines G, cible les résidus dans la région C-Ter de la boucle i3.

Les m1, m4 et m5 sont exprimés de façon prédominante dans le système nerveux central, tandis que les m2 et m3 sont largement exprimés à la fois dans le système nerveux central et dans les tissus périphériques. La plupart des tissus et des types cellulaires expriment au moins deux sous types de mAChR.

Dans le système nerveux central les mAChR régulent un large nombre de fonctions centrales important dont la de processus cognitifs, comportementaux, sensoriels, moteurs et autonomes. De façon notable, les modifications dans les niveaux de mAChRs et leur activité sont impliquées dans la physiopathologie de plusieurs pathologies majeures du système nerveux central, comme la Maladie d'Alzheimer, la Maladie de Parkinson, la dépression et la schizophrénie. Les mAChRs périphériques transmettent l'action de l'Ach dans les tissus effecteurs qui sont innervés par les nerfs parasympathiques. Ces fonctions incluent par exemple la diminution du rythme cardiaque et l'augmentation de la contractilité du muscle lisse et la sécrétion glandulaire (majoritairement transmises par le m3).

La migraine et l'épilepsie partagent des traits communs. Les crises dans le cerveau épileptique sont générées par des dysfonctions de l'excitabilité de réseau et une hypersynchronicité des décharges neuronales. Expérimentalement, l'agoniste cholinergique Carbachol et, plus spécifiquement, les agonistes muscariniques, sont capable d'induire des décharges épileptiques dans le cerveau humain, et augmentent les décharges neuronales dans le cortex humain épileptique.

Dans les études sur la migraine, le Carbachol est utilisé pour étudier l'implication de l'ACh dans les modulations vasculaires dans les attaques de migraine. Compte tenu des résultats observés dans les études sur l'épilepsie, nous pensons qu'il pourrait être opportun d'étudier l'implication de la modulation cholinergique, et l'induction des états UP/DOWN sur tranches de cortex, dans l'hyperexcitabilité de réseau liée à la DCE.

Pour ce faire, une approche expérimentale **pharmacologique** sera réalisée, avec induction de DCE par injection de potassium hautement concentré dans le cortex somato-sensoriel sur tranches de cerveau de souris adulte jeune (P30 à P40), perfusées avec l'agoniste

cholinergique à large spectre Carbachol, qui induit la génération des états UP/DOWN préférentiellement dans cette région. L'étude sur tranches de cerveau de ces UP/DOWN State est tout à fait pertinente car l'état physiologique dans lequel se trouvent les tranches est comparable à celui d'un cerveau qui ne reçoit aucune entrée sensorielle, et comme énoncé plus haut, un cerveau non stimulé peut présenter des activités spontanées comme l'UP/Down State.

L'utilisation d'agonistes et antagonistes muscariniques par la suite permettra l'investigation et la confirmation de l'implication de la modulation dans l'induction de la DCE.

3. EFFET DE L'INVALIDATION DES CANAUX TRESK SUR L'INDUCTION DE LA DCE

Il a été récemment décrit une mutation dominant négatif de canaux K2P TRESK chez des patients d'une même famille présentant une migraine avec aura familiale (Lafrenière et al, 2010). Le mutant TRESK-MT entraîne une hyperexcitabilité des neurones du TG, suggérant son rôle dans le mécanisme pathologique de la migraine.

En 2019 Royal et al, montre que cette mutation de TRESK dans ce cas familiale de migraine avec aura, produit deux protéines : TRESK-MT1 et TRESK-MT2. Le mutant MT1 est inhibé, mais n'a aucun effet sur l'excitabilité des neurones du TG. Le mutant TRESK-MT2 inhibe le canal TRESK et augmente l'excitabilité des neurones ; de plus le TRESK-MT2 s'hétérodimérise avec les canaux TREK1 et TREK2 pour les inhiber.

Dans cette étude, il est aussi montré dans un modèle de souris de double invalidation des canaux TREK1 et TREK2, une augmentation de l'excitabilité des neurones du TG, suggérant que l'action du mutant TRESK-MT2 sur l'excitabilité des neurones du TG est due à son action d'inhibition sur les deux canaux TREK1 et TREK2. Cette inhibition se fait par une action de dominance négative sur ces canaux exercée par le mutant TRESK-MT2. De plus les souris double KO TREK1/TREK2 présentent une allodynie mécanique, communément liée à un phénotype de migraine, appuyant ainsi l'implication de leur inhibition dans le mécanisme de la migraine, et plus particulièrement la douleur de migraine.

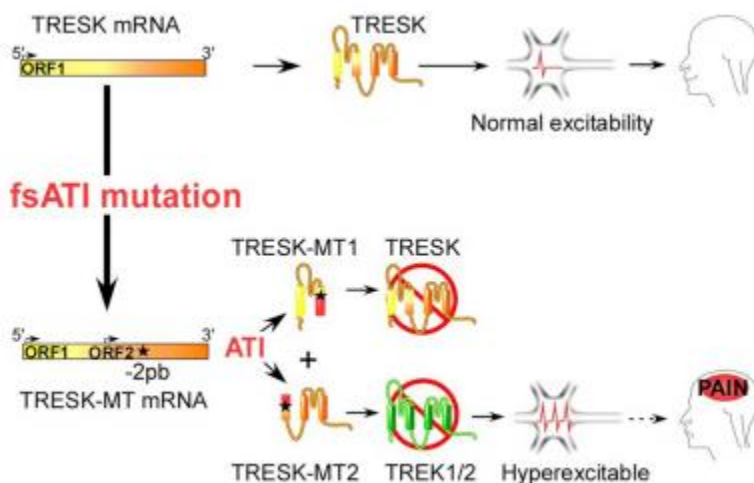


Figure 26 Effet de la mutation de TRESK retrouvé dans le cas familial de migraine avec aura (Royal et al, 2019) (60)

Les canaux TRESK, TREK1 et TREK2 s'expriment aussi au niveau du neocortex. Nous nous sommes intéressés à l'effet de la mutation double KO TREK1 et TREK2 sur l'induction de la DCE, corrélat électrophysiologique de l'aura de migraine. En effet une augmentation de l'excitabilité des neurones, favoriserait une hyperexcitabilité du réseau cortical, et donc l'induction de la DCE.

Pour ce faire, nous avons réalisé des inductions de DCE par injection d'une solution concentrée de KCl dans le néocortex sur tranches de cerveau de souris d'une lignée présentant une double invalidation des canaux TREK1 et TREK 2 (61). Des volumes croissants de KCl sont injectés dans le néocortex, jusqu'à induction de la DCE. La solution de KCl est colorée avec du FastGreen, ce qui permet de visualiser à la caméra non seulement le site d'injection, mais aussi son aire. La susceptibilité à induire une DCE est quantifiée grâce à la mesure de l'aire de la zone d'injection qui a induit la DCE. Ainsi plus l'aire est grande, plus de KCl a été injecté, et plus il a été difficile d'induire une DCE. A l'inverse, plus l'aire est petite, moins il a été nécessaire d'injecter du KCl, plus facile il a été d'induire la DCE.

Cette étude permettra de déterminer un nouveau niveau d'implication de cette mutation TRESK dans le mécanisme pathologique de la migraine.

MATERIEL ET METHODES

MODELE ANIMAL

Ethique et Législation

Les expériences ont été menées en accord avec la directive européenne 2010/63/UE et approuvées par les comités institutionnels et éthiques (accord #C06-152-5). Tous les efforts ont été déployés pour minimiser la souffrance et le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont hébergés en groupe (5 mâles ou 6 femelles par cage ; 1 mâle et 2 femelles maximum par cage d'accouplement) dans des locaux observant un cycle lumière/obscurité de 12 heures, avec eau et nourriture *ad libidum*.

Mon projet de thèse a nécessité l'expérimentation sur lignées sauvage et transgéniques de souris. Toutes les lignées transgéniques de souris proviennent de Jackson Laboratory (USA), et seront détaillées plus loin. Les souris de type sauvage proviennent de Charles River.

Sauf indication contraire, toutes les lignées de souris sont maintenues en Hémizygotés/Hétérozygotés pour le gène d'intérêt, et en rétrocroisement avec un fond génétique C57BL6/J Charles River pour éviter toute dérive génétique.

Pour les expérimentations d'électrophysiologie *in vitro* et *ex vivo*, et de quantification de fluorescence, les souris, mâles et femelles, utilisées sont âgées de 4 à 6 semaines ; pour les expérimentations *in vivo* sur animaux anesthésiés, les souris, mâles et femelles, sont âgées de 4 à 8 semaines. Les animaux sont donc identifiés et génotypés avant l'âge du sevrage (21 jours), par un protocole spécifique à chaque lignées transgéniques.

Lignées Optogénétiques

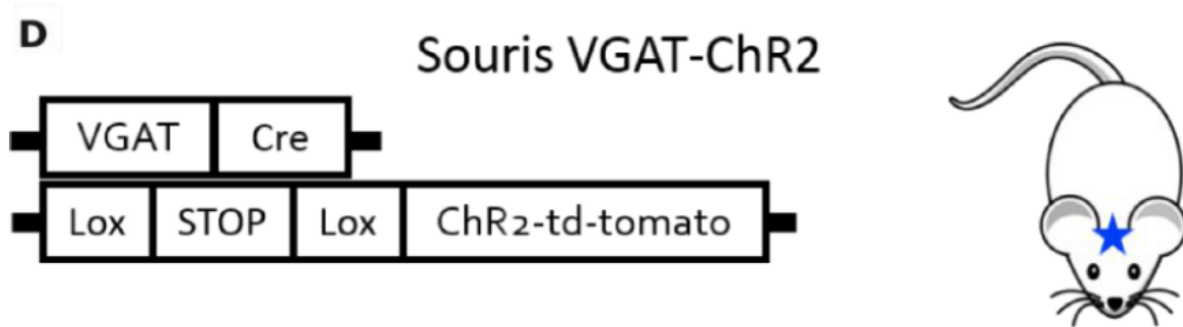
Principale Lignée d'optogénétique : VGAT cre x ChR2-td-tomato lox

Pour faire exprimer la protéine ChR2 spécifiquement dans les neurones GABAergiques, deux lignées transgéniques de souris ont été utilisées, en utilisant la stratégie de système d'expression conditionnelle Cre-Lox. Les souris utilisées en expérimentation sont issues du croisement des deux lignées suivantes :

Lignée VGAT Cre : l'expression de la Cre-recombinase, une enzyme qui permet la recombinaison génétique, est dépendante du promoteur VGAT (transporteur vésiculaire du GABA), spécifique des neurones GABAergiques. Ainsi, cette enzyme ne sera présente que dans cette sous-population neuronale.

Lignée ChR2-td-Tomato lox (Ai27D) : le transgène code pour une protéine fusion, et comprend :

- le gène du canal ChR2 précédé d'un codon STOP flanqué de séquences palindromiques (Lox) cibles de la Cre-recombinase ;
- le gène de la protéine fluorescente rouge tdTomato.



Souris F1 issues du croisement VGAT Cre x ChR2-td-Tomato lox : Dans les souris présentant les deux transgènes, la cassette STOP sera excisée, et ce uniquement dans les interneurons, par l'action de la Cre-recombinase sur les sites lox, conduisant à l'expression membranaire du canal ChR2.

Pour une expression optimale de la ChR2 dans les neurones GABAergiques, les croisements VGAT x ChR2 sont construits comme suivant : Mâle VGAT Cre Hémizygote x Femelle(s) ChR2-td-tomato lox Hémizygotes. Les mâles et femelles accouplés pour obtenir les souris VGAT-ChR2 proviennent de leurs rétrocroisements respectifs.

De plus, grâce à l'expression de la protéine fluorescente tdTomato, lors de la préparation des tranches de cerveau, sa présence est systématiquement vérifiée avec une lampe *Dual Fluorescent Protein NIGHTSEA* qui fournit une lumière verte entre 510-540 nm excitant la protéine Tomato à 581 nm. Des lunettes filtrantes permettent de visualiser le signal fluorescent (rouge).

Autre Lignée d'optogénétique : Dlx5a/Dlx6a-cre x ChR2-td-tomato

Pour confirmer que les résultats obtenus avec les souris « VGAT ChR2 » peuvent être retrouvés dans une autre lignée de souris exprimant la ChR2 dans les neurones GABAergiques, nous avons croisés des Femelles ChR2 avec des mâles Dlx5a/dlx6a cre (sur le même modèle que précédemment présenté). La fluorescence de la Tomato est aussi

vérifiée de la même façon qu'avec la lignée « VGAT Chr2 ». Dlx5a est un élément régulateur du développement des neurones GABAergiques dans le cerveau antérieur (62).

Autre Lignée d'optogénétique : PV-cre x Chr2-td-tomato

Pour certaines expériences, nous avons croisé des souris Chr2 lox Hémizygotés avec des souris issues d'une lignée PV-Cre, chez lesquelles l'expression de la Cre-recombinase est dépendante du promoteur PV ; spécifique des neurones GABAergiques libérant la protéine Parvalbumine, et représentant 5% de la population des neurones GABAergiques.

Lignée d'optogénétique avec invalidation du gène Nav1.1 : SMEI VGAT Chr2

Afin de comprendre l'implication de l'excitabilité des neurones GABAergiques dans l'induction de la CSD dans un contexte d'hyperactivité des neurones GABAergiques, nous avons croisé notre lignée principale d'optogénétique « VGAT-ChR2 » avec des souris d'un modèle génétique d'épilepsie génétique (Syndrome de Dravet) où le gène codant pour le canal Nav1.1 est invalidé, la lignée SMEI. Les animaux issus de ce croisement présentent une mortalité augmentée à partir de P21 ; les animaux sont donc utilisés en expérimentation à partir de cet âge-là.

Lignée avec invalidation des gènes codant pour TREK1 et TREK2

La lignée présentant une double invalidation des gènes codant pour TREK1 et TREK2 ont été générées comme précédemment décrite (61). Les souris mutantes et wild type, toutes des mâles, ont été cédées par Lesage et al.

Génotypage

Les animaux issus de lignées transgéniques, sont génotypés par PCR suivant les protocoles de Jackson lab (cf website de Jax) pour déterminer la présence des gènes d'intérêt, et visualisés par électrophorèse en gel d'agarose. Voici les protocoles de génotypage pour les lignées présentées plus haut (hormis les souris de la ligne double KO TREK1/TREK2).

Procotole de géotypage de la lignée VGAT-Cre

Using Accustart II mouse genotyping Kit (733-2236, 500 reactions, VWR)

I. I. DNA extraction from mouse tails

- Put a small piece of finger/tail in a tube with appropriate animal numbers and add **100 µl/tube** of **Extraction Reagent**

- Warm into the Thermocycler at **95°C** during **30 min** to extract DNA (tissue sample will not dissolve... this is normal)

- Cool samples to room temperature and add **100µl/tube** of **Stabilization buffer**

- Vortex 2-3s

II. II. PCR

- Set up the following PCR reaction

	25 µl/tube
Accustart Genotyping Mix (2X)	12,5µl
H2O Gibco	9,24µl
Primer 7338 (20 µM)	0,63µl
Primer 7339 (20 µM)	0,63µl
DNA	2µl

PCR WT

	25 µl/tube
Accustart Genotyping Mix (2X)	12,5µl
H2O Gibco	9,24µl
Primer 13365 (20 µM)	0,63µl
Primer 13366 (20 µM)	0,63µl
DNA	2µl

PCR Transgene

- Use the following PCR program (**VGAT**):

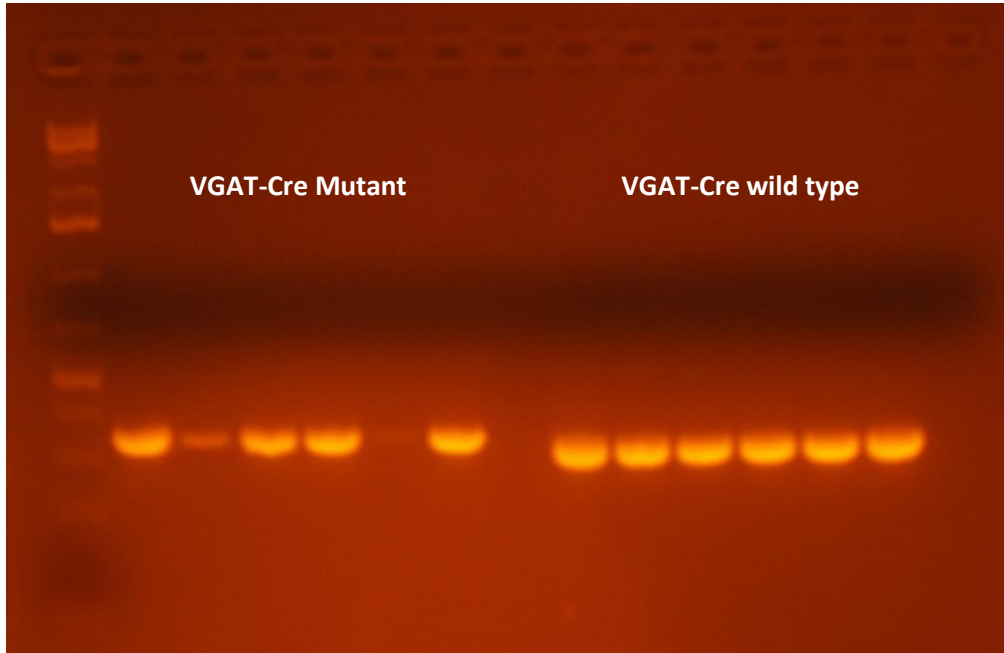
Step 1	94°C-2 min
Step 2	94°C-20sec
Step 3	65°C-15sec (-1,5°C per cycle)
Step 4	68°C-10sec
Step 5	Repeat 10x Step2 to Step4
Step 6	94°C-15sec
Step 7	50°C-15sec
Step 8	72°C-10sec
Step 9	Repeat 28x Step5 to Step7
Step 10	72°C-2min
Step 11	Sustain 4°C – 18h

Preparation gel: 2% Agarose (SuperAgarose, InVitrogen) in TAE 1X
Parameters: 95V - 400mA - 50min

Results: Length bands

Mutant ~350pb and Wild Type ~ 324pb

Exemple de génotypage de la lignée VGAT-Cre



Père : VGAT HEMIZYGOTE

Mère : WT C57BL6/J *Charles River*

Identité Souris	Sexe	Résultats Génotypage
E4. 1 du 01/09/2018	Mâle	HEMI
E4. 2 du 01/09/2018	Mâle	WT
E4. 3 du 01/09/2018	Mâle	HEMI
E4. 4 du 01/09/2018	Mâle	HEMI
E4. 5 du 01/09/2018	Mâle	WT
E4. 6 du 01/09/2018	Mâle	HEMI

Procotole de génotypage de la lignée ChR2-dt-tomato- lox

Using Accustart II mouse genotyping Kit (733-2236, 500 reactions, VWR)

I. DNA extraction from mouse tails

- Put a small piece of finger/tail in a tube with appropriate animal numbers and add **100 µl/tube** of **Extraction Reagent**

- Warm into the Thermocycler at **95°C** during **30 min** to extract DNA (tissue sample will not dissolve... this is normal)

- Cool samples to room temperature and add **100µl/tube** of **Stabilization buffer**

- Vortex 2-3s

II. PCR

- Set up the following PCR reaction

PCR WT	25 µl/tube
Accustart Genotyping Mix (2X)	12,5µl
H2O Gibco	9,24µl
Primer 9020 (20 µM)	0,63µl
Primer 9021 (20 µM)	0,63µl
DNA	2µl

PCR WT

PCR MT	25 µl/tube
Accustart Genotyping Mix (2X)	12,5µl
H2O Gibco	9,24µl
Primer 9103 (20 µM)	0,63µl
Primer 9105 (20 µM)	0,63µl
DNA	2µl

PCR Transgene

- Use the following PCR program (**TOMATO**):

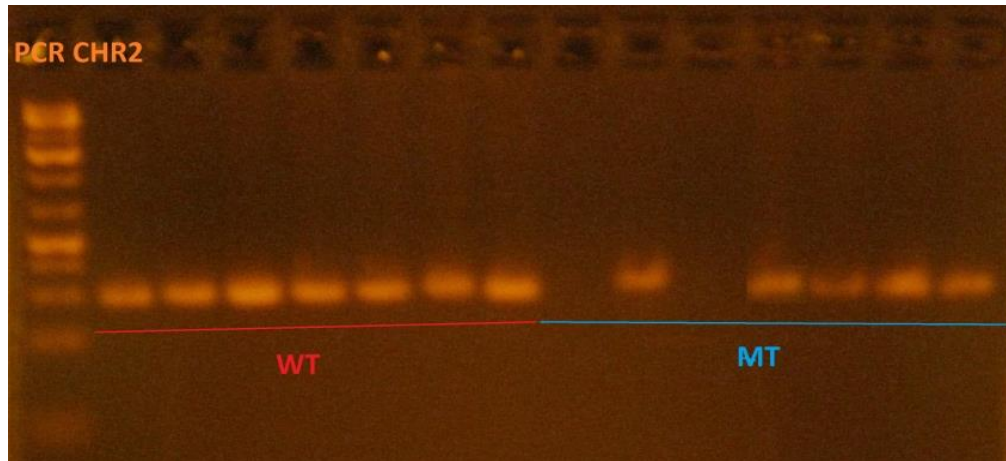
Step 1	94°C-3 min
Step 2	94°C-20 sec
Step 3	61°C-30 sec
Step 4	72°C-30sec
Step 5	Repeat 35x Step2 to Step4
Step 10	72°C-2min
Step 11	Sustain 4°C – 18h

Preparation gel: 2% Agarose (SuperAgarose, InVitrogen) in TAE 1X
Parameters: 95V - 400mA - 50min

Results: Length bands

ChR2 Mutant ~315pb and Wild Type ~ 297pb

Exemple de génotypage de la lignée Chr2-dt-tomato-lox



Père : Chr2 HEMIZYGOTE

Mère : WT C57BL6/J *Charles River*

Identité Souris	Sexe	Résultats Génotypage
D6. 1 du 26/01/2017	Mâle	WT
D6. 2 du 26/01/2017	Femelle	HEMI
D6. 3 du 26/01/2017	Femelle	WT
D6. 4 du 26/01/2017	Mâle	HEMI
D6. 5 du 26/01/2017	Femelle	HEMI
D6. 6 du 26/01/2017	Mâle	HEMI
D6. 7 du 26/01/2017	Mâle	HEMI

Procotole de géotypage de la lignée SMEI

Using Accustart II mouse genotyping Kit (733-2236, 500 reactions, VWR) & Sigma Primers

I. DNA extraction from mouse tails

- Put a small piece of finger/tail in a tube with appropriate animal numbers and add **100 µl/tube of Extraction Reagent**
- Warm into the Thermocycler at **95°C** during **30 min** to extract DNA (tissue sample will not dissolve... this is normal)
- Add **100µl/tube** of **Stabilization buffer**
- Vortex 2-3s
- Cool samples to room temperature

II. DNA Quantification (*not necessary*)

- Take new tubes (*to measure DNA concentration in spectrophotometer*) and put 99µl H₂O + 1µl DNA /tube.
- Set the spectrophotometer for “*double-strain DNA*”, and “*dilution factor: 100*”
- Perform blank with 100µl of H₂O *DNase/RNase free* into the cuvette
- Perform measures with 100µl of diluted samples, and check the purity DNA/Prot (“*A260/280*” ≈ 1.6)
- Prepare new tubes with appropriate animal numbers
- Put in each tube : *Concentration (µg/ml) . 10⁻² – 1* H₂O, so as to have a final concentration 0.1µg/µl (concentration in PCR reaction, see below, will be 8ng/µl).

Example :

- Sample n°1 : 1740µg/ml = 1.74µg/µl

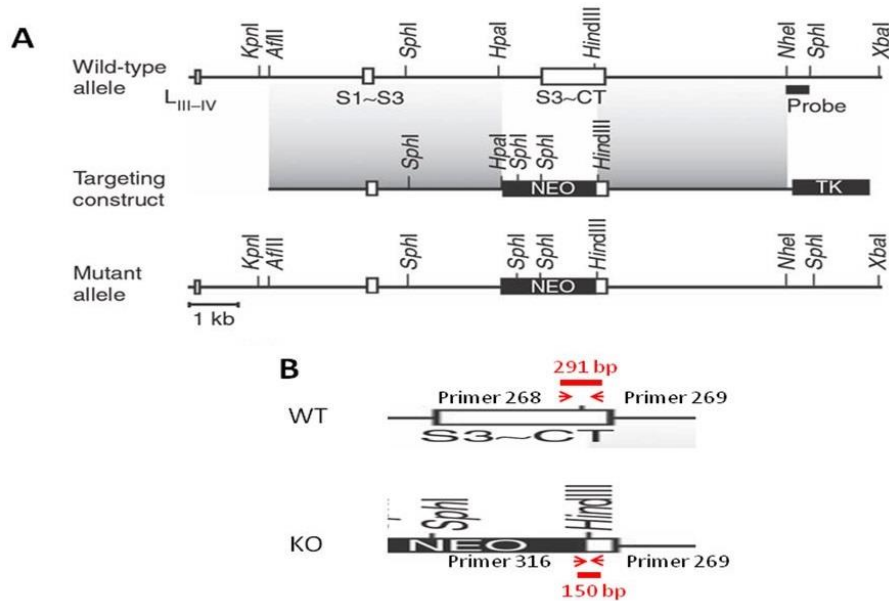
$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$1.74\mu\text{g}/\mu\text{l} \times 1\mu\text{l} = 0.1\mu\text{g}/\mu\text{l} \times V_2$$

$$V_2 = (1.74 \times 1) / 0.1 = 17.4\mu\text{l}$$

So put 1µl DNA in 16.4 µl H₂O (17.4µl total)

III. PCR for Nav1.1 KO mice (SMEI CD1)



Δ Prepare 2 separated Mix tubes for with Primers 269 & 268 on one side and 269 & 316 on the other side (problems with the PCR when they are mixed together)

- Set up the following PCR reaction for each set of primers (25µl Tot):

	25 µl/tube
H ₂ O	9.5µl
Accustart PCR SuperMix (Green)	12.5µl
Primer 269 (5µM)	1µl
Primer 268 or 316 (5µM)	1µl
DNA	1µl

- Use the following PCR program (QUANTAKO):

Step 1	94°C – 3 min
Step 2	94°C – 15s
Step 3	65°C – 15s
Step 4	72°C – 30s
Step 5	Repeat 35x Step2 to Step4
Step 6	72°C – 7 min
Step 7	Sustain 4°C – 18h

KO Mice

Electrophoresis :

- Prepare a 1.2% Agarose gel :
 - 0.72g Agarose + 60ml TAE 1X → heat 2 min in the microwave (800W)
 - 3 µl BET (▲ Intercalating Agent → use gloves!)
 - Cast the gel in a mold for 45min
- Drop 10µl of "1kb plus marker into a well in the gel, and 10µl of each sample in other wells
- Program the electrophoresis machine:

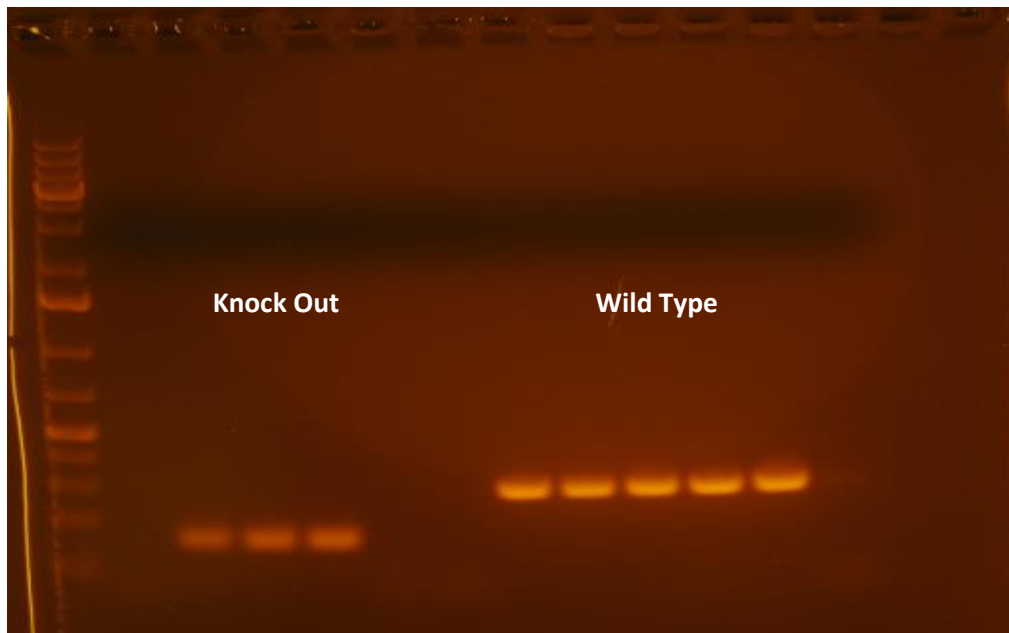
Voltage	95 V
Intensity	300 mA
Time	50 min

- Observe the result with Gel Imager (*Compact Digimage System*)
 - Homozygote +/+ : 1 band (*WT alleles*)
 - Hétérozygote +/- : 2 bands (*2 alleles ≠*)
 - Homozygotes -/- : 1 band (*2 homozygous alleles*)

Sequences (5'-3') primers (SIGMA):

- 268** CGAATCCAGATGGAAGAGCGGTTTCATGGCT (Length 30)
- 269** ACAAGCTGCTATGGACATTGTCAGGTCAGT (Length 30)
- 316** TGGCGCTCGATGTTTCAGCCCAAGC (Length 24)

Exemple de génotypage de la lignée SMEI



Père : Nav1.1-/+

Mère : WT

Identité Souris	Sexe	Résultats Génotypage
#1 du 05/08/2017	Mâle	WT
#2 du 05/08/2017	Femelle	HTZ
#3 du 05/08/2017	Femelle	HTZ
#4 du 05/08/2017	Mâle	HTZ
#5 du 05/08/2017	Femelle	WT

Protocole de géotypage de la lignée PV-Cre

Using Accustart II mouse genotyping Kit (733-2236, 500 reactions, VWR)

I. DNA extraction from mouse tails

- Put a small piece of finger/tail in a tube with appropriate animal numbers and add **100 µl/tube** of **Extraction Reagent**
- Warm into the Thermocycler at **95°C** during **30 min** to extract DNA (tissue sample will not dissolve... this is normal)
- Cool samples to room temperature and add **100µl/tube** of **Stabilization buffer**
- Vortex 2-3s

II. PCR

- Set up the following PCR reaction

	25 µl/tube
Accustart Genotyping Mix (2X)	12,5µl
H2O Gibco	9,24µl
Primer 8290 (20 µM)	0,63µl
Primer 8291 (20 µM)	0,63µl
DNA	2µl

PCR WT

	25 µl/tube
Accustart Genotyping Mix (2X)	12,5µl
H2O Gibco	9,24µl
Primer 1084 (20 µM)	0,63µl
Primer 1085 (20 µM)	0,63µl
DNA	2µl

PCR Transgene

- Use the following PCR program (**PV**):

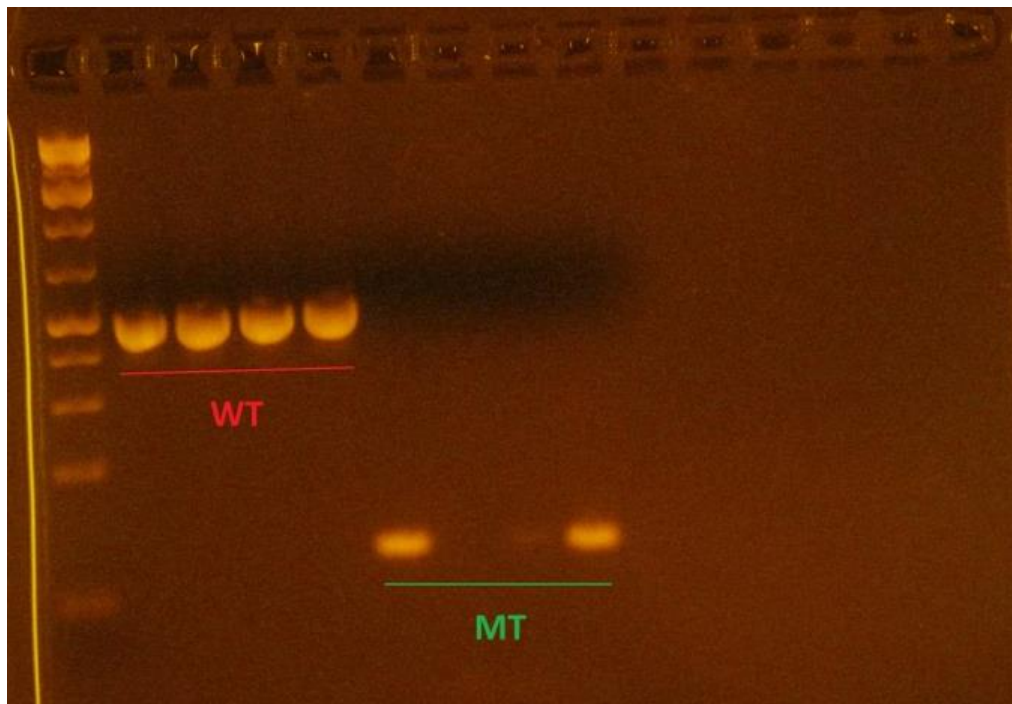
Step 1	94°C-2 min
Step 2	94°C-20sec
Step 3	65°C-15sec (-0,5°C per cycle)
Step 4	68°C-10sec
Step 5	Repeat 10x Step2 to Step4
Step 6	94°C-15sec
Step 7	60°C-15sec
Step 8	72°C-10sec
Step 9	Repeat 28x Step6 to Step8
Step 10	72°C-1min
Step 11	Sustain 4°C – 18h

Preparation gel: 2% Agarose (SuperAgarose, InVitrogen) in TAE 1X
Parameters: 95V - 400mA - 50min

Results: Length bands

Mutant ~100pb and Wild Type ~500pb

Exemple de génotypage de la lignée PV-Cre



Père : PV HEMIZYGOTE

Mère : WT C57BL6/J *Charles River*

Identité Souris	Sexe	Résultats Génotypage
P3. 1 du 25/03/2016	Mâle	HEMI
P3. 1 du 25/03/2016	Mâle	WT
P3. 1 du 25/03/2016	Mâle	WT
P3. 1 du 25/03/2016	Mâle	HEMI

Protocole de géotypage de la lignée Dlx5/6-Cre

Using Accustart II mouse genotyping Kit (733-2236, 500 reactions, VWR)

I. DNA extraction from mouse tails

- Put a small piece of finger/tail in a tube with appropriate animal numbers and add **100 µl/tube** of **Extraction Reagent**
- Warm into the Thermocycler at **95°C** during **30 min** to extract DNA (tissue sample will not dissolve... this is normal)
- Cool samples to room temperature and add **100µl/tube** of **Stabilization buffer**
- Vortex 2-3s

II. PCR

- Set up the following PCR reaction

	25 µl/tube
Accustart Genotyping Mix (2X)	12,5µl
H2O Gibco	9,24µl
Primer 7338 (20 µM)	0,63µl
Primer 7339 (20 µM)	0,63µl
DNA	2µl

PCR WT

	25 µl/tube
Accustart Genotyping Mix (2X)	12,5µl
H2O Gibco	9,24µl
Primer 1084 (20 µM)	0,63µl
Primer 1085 (20 µM)	0,63µl
DNA	2µl

PCR Transgene

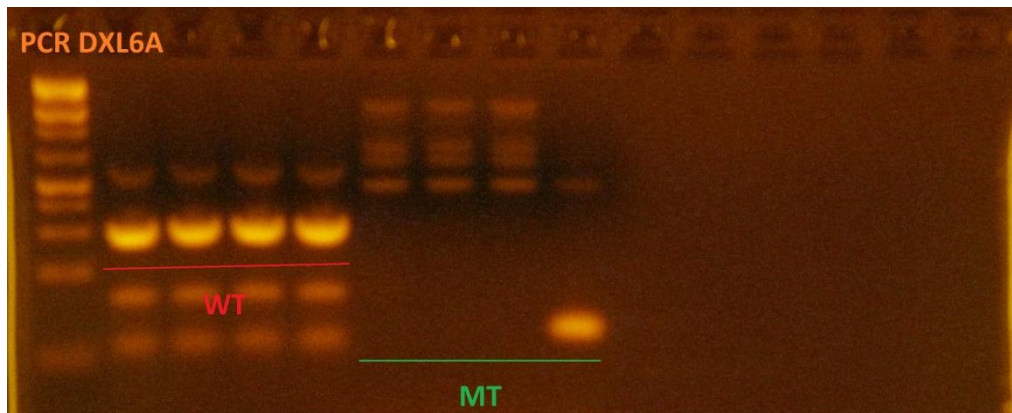
- Use the following PCR program (**DXL**):

Step 1	94°C-3 min
Step 2	94°C-30sec
Step 3	51,7°C-1min
Step 4	72°C-1 min
	Repeat 35x Step2 to Step4
Step 5	72°C-2 min
Step 6	Sustain 4°C – 18h

Preparation gel: 2% Agarose (SuperAgarose, InVitrogen) in TAE 1X
Parameters: 95V-300mA-50min

Results: Length bands
Mutant ~100pb and Wild Type ~324pb

Exemple de génotypage de la lignée Dlx5/6-Cre



Père : Dlx5/6 HEMIZYGOTE *Jax*

Mère : WT C57BL6/J *Charles River*

Identité Souris	Sexe	Résultats Génotypage
L1. 1 du 27/12/2016	Mâle	WT
L1. 2 du 27/12/2016	Mâle	WT
L1. 3 du 27/12/2016	Mâle	WT
L1. 4 du 27/12/2016	Mâle	HEMI

ENREGISTREMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES

Préparation des tranches de cerveau pour enregistrements électrophysiologiques ex vivo

Afin de pouvoir observer des activités synchrones de réseaux neuronaux *ex vivo*, il est nécessaire de réaliser des enregistrements extracellulaires sur tranches de cerveau maintenues en vie.

Les animaux sont anesthésiés par voies aériennes avec de l'isoflurane (Iso-Vet) puis décapités, le cerveau est rapidement prélevé et des tranches coronales de 400 ou 300 μm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un Microtome à vibrations (HM650 V, Microm, Allemagne). La dissection est effectuée à froid (2°C) dans du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCR artificiel) dit *standard* saturé en Carbogène (95% O_2 , 5% CO_2), pH 7,2-7,4, 300 mOsm/L. Composition (en mM) : NaCl 125, KCl 2,5, CaCl_2 2, NaH_2PO_4 1,25, MgCl_2 1, Glucose 25, NaHCO_3 25.

Les tranches sont ensuite maintenues au repos dans une chambre de stockage submergée (LCR artificiel saturé en carbogène) à 32°C , pendant 60 minutes avant le début de l'enregistrement.

Les tranches de cerveau sont transférées dans la chambre d'enregistrement d'un poste d'électrophysiologie, continuellement perfusée avec du LCR artificiel dit *modifié*, saturé en carbogène à 34°C , à un débit de 3 à 4 mL/min. Composition (en mM) : NaCl 125, KCl 3,5, CaCl_2 1, NaH_2PO_4 1,25, MgCl_2 0.25, Glucose 25 et NaHCO_3 25.

Les tranches sont immobilisées dans la chambre par une grille (Slice Anchor SDH-26G 15 \times 19 mm Warner Instruments), 10 minutes d'attente sont observées avant le début des enregistrements. Le niveau de LCR artificiel dans la chambre d'enregistrement est régulé par aspiration.

Induction de la Dépression Corticale Envahissante ex vivo

La DCE peut être induite par différentes techniques, de spécificité variable : stimulation électrique, pinprick (piqûre d'épingle), injection locale de KCl, élévation de la [KCl] dans le bain d'ACSF, stimulation optogénétique, pharmacologie.

Modèle d'induction par injection de KCl 130mM

L'un des modèles d'induction de DCE utilisés pour ce projet est l'injection locale de potassium (KCl), 130 mM, hautement concentré tout en restant physiologique. Une solution de KCl 130 mM est mélangée au colorant Fast Green à 0,1 % pour que le site d'injection soit visible à la caméra. Il a été vérifié préalablement qu'une injection de Fast Green 0,1 % n'induit pas de DCE à elle seule. Une pipette de verre est remplie avec la solution de KCl 130 mM + Fast Green 0,1 %, puis placée dans la tranche de cerveau au niveau des couches II-III. La pipette de KCl est reliée à un appareil injectant de l'air comprimé (Pneumatic PicoPump PV820). La pression utilisée est de 7 psi (soit environ 0,5 bar).

Pour comparer la susceptibilité au déclenchement de la DCE, nous utilisons plusieurs injections de KCl de manière à déterminer le volume minimum nécessaire pour déclencher une DCE, alors défini comme seuil. Nous réalisons une série d'injections de KCl (130 mM) dans le cortex, avec des durées d'injection croissantes, en prenant soin de séparer suffisamment les sites d'injection, jusqu'à déclencher une DCE. La gamme de temps d'injections utilisée est : 50, 100, 300, 500, 700, 900, 1100 et 1300 ms. Plus la durée d'injection est importante, plus le volume injecté est grand. Le Fastgreen étant dilué dans la solution de KCl, le volume d'injection est ensuite estimé *a posteriori* sur les images collectées, en évaluant le diamètre (μm) du halo bleu-vert formé dans le tissu lors de l'injection ayant déclenché la DCE (logiciel Image J).

Si la DCE n'est pas induite au plus au seuil d'injection, une dernière injection de 1500 ms est réalisée. La tranche sera considérée comme non viable et éliminée si la DCE ne s'induit pas. La tranche comptabilisée si la DCE est induite avec une injection de 1500 ms.

Modèle d'induction par stimulation Optogénétique

La stimulation optogénétique est réalisée sur les tranches de cerveau issues de souris exprimant la Chr2 dans les neurones GABAergiques. La source lumineuse utilisée est un Halogène (Nikon Intensilight C-HGFI, ampoule 100 W) la lumière blanche est filtrée grâce à un filtre à 470 nm (Semrock FF02-475/50 ; bande passante 50 nm) et les UV grâce à un filtre bloquant 420 nm (series 2000, Lumatec, Allemagne). L'illumination se fait directement par l'objectif (4x) du microscope, à une puissance de 2,8 mW/mm² sur une surface projetée sur la tranche de 38,5 mm². La stimulation se fait au niveau d'un hémisphère, en se focalisant sur le cortex somatosensoriel, jusqu'à ce que la DCE apparaisse à l'écran.

La sensibilité au déclenchement de la DCE se détermine par la latence d'induction, c'est-à-dire le temps nécessaire d'illumination pour que la DCE soit induite, à partir des

enregistrements électrophysiologiques et des vidéos collectées. Seules les DCE induites dans le champ de la caméra sont prises en compte car elles permettent une mesure précise et réelle de la latence. Les DCE induites hors champ ne permettent pas cette mesure, et sont donc éliminées.

Le temps maximum d'illumination est de 90 secondes. Si la DCE n'est pas induite, un temps de repos de deux minutes est observé, puis une injection de KCl 130 mM est faite pour déterminer si la tranche est viable. Si l'injection de KCl 130 mM n'induit pas de DCE, la tranche n'est pas considérée comme viable et est donc éliminée des effectifs. Si l'injection induit une DCE, la tranche est considérée comme viable et l'induction par optogénétique comme un échec.

Pour mieux contrôler la zone d'induction de la DCE par optogénétique, nous avons utilisé l'**illumination spatiale** grâce à un Polygone400 additionné à la source lumineuse. Il utilise une technologie DMD (digital mirror device) qui repose sur plusieurs centaines de micro miroirs qui peuvent être inclinés individuellement pour laisser ou non passer la lumière. A l'aide du logiciel associé, il est ainsi possible de créer des motifs, mais surtout de contrôler la zone d'illumination.

Enregistrements électrophysiologiques ex vivo – Potentiel de Champ sur tranches

Le type d'enregistrement électrophysiologique utilisé pour cette étude est un enregistrement de potentiel de champ. La technique de potentiel de champ permet de mesurer des variations de potentiels électriques extracellulaires dans une zone donnée de la tranche. Il s'agit d'un enregistrement extracellulaire de l'activité électrique d'un groupe local de neurones, en l'occurrence ici, de neurones corticaux. L'activité électrique des neurones entraîne des mouvements d'ions entre les milieux extracellulaires et intracellulaires. Ceux-ci vont créer des différences de potentiel de part et d'autre de la membrane plasmique, et générer un champ électrique enregistrable à l'aide d'une électrode placée dans le milieu extracellulaire.

Lors d'une dépression corticale envahissante, les cellules du cortex et notamment les neurones se dépolarisent de manière synchronisée. Ainsi, grâce à une électrode extracellulaire, nous pouvons enregistrer ce phénomène. Dans nos conditions expérimentales, il correspond à une large déflexion négative de plusieurs millivolts, durant plusieurs minutes. L'électrode d'enregistrement en argent, chlorurée, est placée dans une pipette en verre remplie d'ACSF modifié, et positionnée à l'aide d'un micromanipulateur dans le tissu cortical, au niveau des couches corticales III et IV. L'électrode de référence est placée dans la chambre d'enregistrement, plongée dans le LCR artificiel. Le signal électrique est transmis à un amplificateur (Multiclamp 700B, Axon

CNS Molecular Devices) puis converti en signal numérique transmis à l'ordinateur grâce à un Digidata 1440A (Axon CNS, Molecular Devices). Les enregistrements électrophysiologiques sont analysés avec le logiciel Clampfit 10.3 (Molecular Devices).

Enregistrements électrophysiologiques ex vivo – Whole cell Patch-clamp sur tranches

Pour enregistrer l'activité électrique d'un neurone avant pendant et après l'induction de la DCE par stimulation optogénétique, la technique utilisée sera l'enregistrement intracellulaire patch clamp en configuration cellule entière (whole cell) et courant imposé (current clamp) pour observer les variations de différences potentiel membranaire de toute la cellule.

L'électrode d'enregistrement en argent est chlorurée et placée dans une pipette en verre d'une résistance située entre 2.8 et 3.5 M Ω . Préférentiellement, la recherche de neurones se fait dans les couches II et III, les neurones excitateurs et inhibiteurs sont repérés d'abord par leur morphologie, puis par le type de réponse lors d'un protocole de Input/Output. Les neurones inhibiteurs GABAergiques les plus remarquables sont les neurones PV Fast Spiking.

L'électrode est remplie d'une Solution dite Intracellulaire composée de (en mM) : K-Gluconate 120, KCl 15, MgCl₂ hexahydrate 2, EGTA 0.2, HEPES 10 mM ; P-Créatine 20, ATP salt 2, GTP 0.2, Leupeptine 0.1. Le pH de la solution intracellulaire est ramené à 7.2.

L'électrode de référence est placée dans la chambre d'enregistrement, plongée dans le LCR artificiel. Le signal électrique est transmis à un amplificateur (Multiclamp 700B, Axon CNS Molecular Devices) puis converti en signal numérique transmis à l'ordinateur grâce à un Digidata 1440A (Axon CNS, Molecular Devices). Les enregistrements électrophysiologiques sont analysés avec le logiciel Clampfit 10.3 (Molecular Devices).

Pharmacologie

Traitements pharmacologiques des tranches de cerveau pour l'étude optogénétique :

Lorsqu'un traitement pharmacologique est nécessaire, les tranches de cerveau sont incubées directement dans la chambre d'enregistrement, dans du LCR modifié avec la substance pharmacologique d'intérêt. Un temps d'incubation de 15 minutes est observé avant le début de l'expérience. Si la substance le permet, l'incubation en chambre d'enregistrement se fait en circuit ouvert. Sinon, par soucis d'économie, la perfusion se fait en circuit fermé.

Traitements pharmacologiques des tranches de cerveau pour l'étude carbachol :

Après un temps de repos en chambre de stockage d'une heure environ, les tranches de cerveau sont transférées dans une autre chambre de stockage avec LCR artificiel standard + **Carbachol**, **Atropine** ou **Carbachol + Atropine**, pendant 30 minutes. Les tranches sont ensuite transférées dans la chambre d'enregistrement perfusées avec du LCR artificiel modifié + pharmacologie associée en circuit ouvert. Pour ce qui est de l'incubation en **McN-A-343**, par soucis d'économie de la substance, les tranches sont directement transférées, perfusées et incubées dans la chambre d'enregistrement pendant 30 minutes en circuit fermé.

Substances utilisées, concentrations et fournisseurs :

Substances	Concentrations utilisées	Fournisseurs
TTX	2 µM	Sigma Aldrich
NBQX / CNQX	20 µM	Alomone Labs
CPP	10 µM	Alomone Labs
Gabazine	15 µM	Sigma Aldrich
Hm1a	10 nM	Smartox
Cadmium	100 µM	Sigma Aldrich
Isoguvacine	10 µM	Sigma Aldrich
VU 024551	10 µM	Tocris Biosciences
VU 0463271	10 µM	Tocris Biosciences
Carbachol	100 µM	Sigma Aldrich
McN-A-343	30 µM	Sigma Aldrich
Atropine	10 µM	Sigma Aldrich

Analyses Statistiques

Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel Graphpad Prism 6. Le test de Student (test T, test paramétrique) et le test de Mann Whitney (test non paramétrique) ont été utilisés pour comparer deux groupes indépendants. Le test de Kruskal et Wallis (non paramétrique) pour comparer trois groupes indépendants, suivi d'un test de Dunn (test de comparaisons multiples). Les tests non paramétriques ont été privilégiés pour des échantillons inférieurs à 30. Avant l'utilisation du test de Student, la normalité de distribution des échantillons (test de Shapiro-Wilk) et l'homogénéité de variance entre deux échantillons (test de Fisher-Snedecor) ont été vérifiées. Le test exact de Fischer a été utilisé pour l'analyse de la table de contingence.

Dans le texte les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM.

Le seuil de significativité statistique est de 0.05. * correspond à $p < 0.05$, ** à $p < 0.01$, *** à $p < 0.001$.

RESULTATS

PARTIE 1 – ROLE DE
L'ACTIVATION DU $Na_v1.1$ ET
DES NEURONES
GABAERGIQUES DANS
L'INDUCTION DE LA DCE

GABAergic neurons and Nav1.1 channel hyperactivity: novel Cortical Spreading Depression mechanism.

Oana Chever^{1,2,#,*}, Sarah Zerimech^{1,2,#}, Alexandre Loucif^{1,2}, Marion Ayrault^{1,2}, Fabrice Duprat^{1,2}, Sandrine Cestèle^{1,2} and Massimo Mantegazza^{1,2,*}

1 Université Côte d'Azur, Valbonne-Sophia Antipolis, France.

2 CNRS UMR7275, Institute of Molecular and Cellular Pharmacology (IPMC), Valbonne-Sophia Antipolis, France.

Co-first authors

* Co-corresponding authors:

Oana Chever: oana.chever@univ-rouen.fr

and

Massimo Mantegazza: mantegazza@ipmc.cnrs.fr

Institute of Molecular and Cellular Pharmacology (IPMC), CNRS UMR 7275 and Université Côte d'Azur, 660 Route des Lucioles, 06560 Valbonne-Sophia Antipolis, France. Tel. +33 (0)493953425 FAX +33 (0)493957708

Short title: GABAergic neurons hyperactivity in CSD.

- *Title pages* should include the title, the name(s) and institutional affiliation(s) of the author(s), the full address, telephone and facsimile numbers as well as the e-mail address of the corresponding author, and a brief running title
- *Abstracts* should be no more than 200 words
- *Keywords* (up to five) should be provided, in alphabetical order, and should characterize the scope of the paper, the principal materials, and main subject of work. (Keywords are important for your paper to be found through Internet searching, and therefore should be selected carefully and should not repeat words that appear in the title.)
- *Introduction* (without a separate heading) should indicate the objectives, significance or hypothesis, when applicable, and a concise summary of the background of the study. Lengthy reviews of the status of the field are discouraged in research articles
- *Materials and Methods*
- *Results*
- *Discussion*
- *Acknowledgments*, including any grants, disclaimers or sources of support (along with the address of the corresponding author)
- *References* used

If you would like additional help with the quality of your written English, including grammar, spelling, and language usage, visit [Oxford Journals Language Services](#). There will be a charge for this service.

Abstract

Cortical spreading depression (CSD) is a pathologic mechanism of migraine. We have identified a novel mechanism of CSD initiation and a novel pathological role of GABAergic neurons. Mutations of the Nav1.1 sodium channel (the SCN1A gene) cause Familial Hemiplegic Migraine type-3 (FHM 3), a subtype of migraine with aura. They induce gain-of-function of Nav1.1 and hyperexcitability of GABAergic interneurons in culture. However, the mechanism linking these dysfunctions to CSD and FHM3 has not been elucidated. Here, we show that hyperactivity of cortical interneurons or Nav1.1 gain-of-function is sufficient to ignite CSD by spiking-induced extracellular K⁺ build-up. GABAergic and glutamatergic synaptic transmission was not required for CSD initiation, but glutamatergic transmission was implicated in CSD propagation in the cortex. Our results reveal the key role of Nav1.1 and GABAergic neurons in a novel mechanism of CSD initiation, relevant for FHM3 and possibly also for other types of migraine.

Keywords: FHM, aura, SCN1A,

Introduction

The proposed mechanism of migraine with aura (MA) is cortical spreading depression (CSD), a wave of transient intense network hyperexcitability leading to a long lasting depolarization block of neuronal firing. CSD initiates focally and then slowly propagates in the cerebral cortex, causing migraine aura and possibly inducing headache by sensitization of meningeal nociceptors (Ferrari, Klever et al., 2015, Pietrobon & Moskowitz, 2014). CSD events have been observed and extensively studied for decades, but specific pathological mechanisms that lead to CSD initiation are still far from being completely understood and sorted out. A mendelian form of MA characterized by hemiparesis during the attacks, Familial Hemiplegic Migraine (FHM), has allowed the identification of some molecular/cellular pathological mechanisms (Ferrari et al., 2015, Pietrobon & Moskowitz, 2014), and has become a model disease for more common forms and for studies of mechanisms of CSD. FHM type 1 (FHM1) is caused by gain of function mutations of the $\alpha 1$ subunit of the Cav2.1 P/Q type Ca^{2+} channel (the *CACNA1A* gene) (Ophoff, Terwindt et al., 1996), FHM type 2 (FHM2) by loss-of-function mutations of the $\alpha 2$ subunit of the glial Na^+/K^+ pump (the *ATP1A2* gene) (De Fusco, Marconi et al., 2003). Increased susceptibility to experimentally ignited CSD has been reported in FHM1 and FHM2 genetic mouse models (Leo, Gherardini et al., 2011, van den Maagdenberg, Pietrobon et al., 2004), which is caused by increased network excitability induced by excessive release or insufficient reuptake of glutamate (Capuani, Melone et al., 2016, Tottene, Conti et al., 2009, Vecchia, Tottene et al., 2014), consistent with a similar overall mechanism. FHM3 is caused by mutations of Nav1.1 (*SCN1A*) Na^+ channel (Dichgans, Freilinger et al., 2005), which is particularly important for GABAergic neurons' excitability (Yu, Mantegazza et al., 2006). Numerous epileptogenic Nav1.1 mutations have been identified; they cause loss-of-function of the channel leading to decreased excitability of GABAergic neurons, reduced inhibition and consequent hyperexcitability of cortical networks (Catterall, Kalume et al., 2010, Guerrini, Marini et al., 2014, Hedrich,

Liautard et al., 2014, Ogiwara, Miyamoto et al., 2007, Yu et al., 2006). We and others have provided evidence that, in contrast to epileptogenic mutations, FHM3 mutations cause instead gain-of-function of the channel and hyperexcitability of transfected GABAergic neurons in primary culture (Cestele, Labate et al., 2013a, Cestele, Scalmani et al., 2008, Cestele, Schiavon et al., 2013b, Fan, Wolking et al., 2016, Mantegazza & Cestele, 2017). Thus, these results point to different, novel and counterintuitive mechanisms in comparison to FHM1 and FHM2 mutations. However, there is not yet a causal link between Nav1.1 gain-of-function/GABAergic neurons' hyperactivity and CSD, and it is not clear whether and how CSD could be generated by these dysfunctions. In particular, this would be a novel pathological role for GABAergic neurons, which have never been implicated before in CSD generation. Here, we addressed these issues inducing acute Nav1.1 gain-of-function and performing selective optogenetic stimulation of GABAergic neurons, carrying out experiments *in vivo*, *ex vivo* in brain slices and *in vitro* in cell lines.

Materials and Methods

Animal care and mouse lines.

Experiments were carried out according to the European directive 2010/63/UE and approved by institutional and ethical committees (approval #C06-152-5). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. They were group housed (5 mice per cage, or 1 male and 2 females per cage for breeding) on a 12 h light/dark cycle, with water and food ad libidum. Mouse lines have been obtained from Jackson laboratory (JAX, USA).

To have specific expression of channelrhodopsin-H134R/tdtomato in GABAergic neurons, most of the experiments have been performed with male and female double hemizygous transgenic mice VGAT-hChr2(H134R)/tdtomato (VGAT-ChR2 in the text) and control littermates (F1 generation). They were obtained by mating hemizygous females loxP-STOP-loxP-hChr2(H134R)-tdtomato (Ai27D, B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm27.1(CAG-COP4*H134R/tD Tomato)Hze/J, JAX n°012567) (Madisen, Mao et al., 2012) with transgenic males (to avoid off-target Cre expression in the female germline) hemizygous for the *Vgat-Cre* transgene (Cre recombinase expression driven by the vesicular GABA transporter, VGAT, promoter) (B6.FVB-Tg(Slc32a1-Cre)2.1Hzo/FrkJ, JAX n°017535), line 2.1 in (Chao, Chen et al., 2010). To avoid germline transmission of recombined floxed alleles (see www.jax.org/strain/017535), we have never used VGAT-ChR2 F2 offspring. VGAT-Cre mice have been used in several papers for obtaining specific expression of floxed alleles in GABAergic neurons (Baalman, Marin et al., 2015, Chao et al., 2010, Li, Zhong et al., 2016, Wagnon, Mahaffey et al., 2011, Wang, Wang et al., 2014). Furthermore, to show that similar results could be obtained with a different cre GABAergic mouse line, we also crossed hemizygous female loxP-STOP-loxP-hCHR2(H134R)/tdtomato mice with hemizygous males expressing Cre-recombinase under the *Dlx5/6* promoter (*Tg(dlx6a-cre)1Mekk/J*; JAX n°008199). For some

experiments, we used a mouse line that expressed hChR2(H134R)/tdtomato selectively in Parvalbumin (PV) positive GABAergic neurons, obtained crossing loxP-STOP-loxP-hChR2(H134R)/tdtomato mice with knock-in mice expressing Cre-recombinase under the PV promoter (B6;129P2-Pvalbtm1(Cre)Arbr/J; JAX n°008069). To evaluate the effect of a reduction of Nav1.1 expression in interneurons, we crossed hemizygous VGAT-ChR2 mice with heterozygous Nav1.1 knock-out mice (Nav1.1^{+/-}) (Yu et al., 2006). Moreover, for immunohistochemistry, we used mice expressing a floxed td-tomato transgene (Ai9, B6;129S6-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze/J}; Jackson Lab. n°007905) as a cell filling reporter line, because it was difficult to identify hChR2(H134R)/tdtomato expressing cells with the plasma membrane fluorescence of the tagged ChR2 in VGAT-ChR2 mice. Mouse lines were in the C57BL/6J background (>10 generations, Charles River, USA), except for the PV-Cre (129P2/OlaHsd+C57BL/6J N1F13), the Dlx5/6-Cre (CD1+ C57BL/6J N1F3), and the Nav1.1^{+/-} (C57BL/6J-CD1 85:15%) mouse strains.

Offspring was genotyped either by PCR, following the standard JAX protocols, using our standard protocol for Nav1.1 knock-out mice (Liautard, Scalmani et al., 2013) or, for mice with cell filling fluorescent protein, controlling the fluorescence of newborn mice with a Dual Fluorescent Protein Flashlight (NightSea, USA). We used mice of both sexes, 4-6 weeks old for *ex-vivo* experiments and 4-8 weeks old for *in vivo* experiments. The data presented in this manuscript was collected on a total of 109 mice.

Preparation of brain slices, electrophysiological recordings and imaging in slices.

Brain slices were prepared as previously described (Hedrich et al., 2014, Liautard et al., 2013). Briefly, mice were killed by decapitation under isoflurane anesthesia, the brain was quickly removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF), which contained (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃ and 25 glucose, saturated with 95 % O₂ - 5 % CO₂. Acute coronal slices 400 µm thick (300

μm for spatial illumination and patch-clamp experiments) were prepared with a vibratome (HM650V, MicroM, Germany) in ice-cold ACSF. Slices were then stored in a submerged chamber with ACSF at 34°C at least one hour before the beginning of the recordings. Selective brain expression of the Chr2(H134R)/tdTomato transgene and thus absence of germline recombination of the floxed allele was systematically confirmed by visual inspection of slices and of other tissues of the mouse using the NightSea Flashlight (USA). Inductions of CSD started > 10min after placing an individual slice in the recording chamber (RC-26GLP; Warner Instruments, USA), which was perfused with recording ACSF (rACSF) (Tottene et al., 2009) at 34°C, containing (in mM): 125 NaCl, 3.5 KCl, 1 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃ and 25 glucose, saturated with 95 % O₂ - 5 % CO₂. Slices were visualized using infra-red differential interference contrast (DIC) microscopy (Nikon Eclipse FN1, Japan) equipped with a CCD camera (CoolSnap ES2, Photometrics, USA), filter cubes for visualization of fluorescent proteins (Semrock, USA) and a filter for optogenetic 475 nm blue light illumination (FF02-475/50; Semrock, USA). Electrophysiological signals were recorded with a Multiclamp 700B amplifier (CV-7B headstage), a Digidata 1440A acquisition board and pClamp 10.3 software (Molecular Devices, USA). DC extracellular potential recordings were performed using borosilicate glass micropipettes (~0.5 M Ω) filled with rACSF. Whole-cell recordings were performed in the layer 5 of the neocortex using borosilicate glass pipettes of 4–6 M Ω resistance containing (in mM): 120 K-gluconate, 15 KCl, 2 MgCl₂, 0.2 EGTA, 10 HEPES, 1.5 QX-314, 20 P-Creatine, 0.2 GTP, 2 Na₂-ATP, 0.1 leupeptin, adjusted to pH 7.3 with KOH. Whole-cell access resistance (10-25 M Ω) was monitored and cells showing instable access resistance (> 20 %) were discarded. To evoke post-synaptic currents, we used a bipolar tungsten electrode (WPI, USA) placed in layer 2/3 above the recorded cells, and stimuli were delivered at a low frequency (0.05Hz) with a constant current isolator (0.30 ms, 0.1-10 mA; SIU 91, Cygnus tech., USA). Evoked postsynaptic currents, with constant latency (~ 5 ms) and single-peaked, were recorded in layer 5 pyramidal neurons, at the holding potential of -60 mV. Stimulus intensity/response curves were first obtained and the stimulus intensity was then set in order to obtain the maximum response prior to

bath application with Cd^{2+} . Ion sensitive electrodes were built with glass pipettes (tip diameter $\sim 2 \mu\text{m}$) as previously described (Chever, Djukic et al., 2010). Briefly, they were first cleaned with absolute ethanol, then pre-treated with dimethylchlorosilane vapors (Sigma-Aldrich, USA), dried at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2 h, and finally the tip was backfilled with the K^+ ionophore I-cocktail B (Fluka, Sigma-Aldrich, USA) using a 28G microfil (WPI, USA). The calibration was done for each microelectrode using solutions of different K^+ concentrations (2.5, 3.5, 35, and 90 mM: KCl added to the ACSF), and electrodes were selected according to the slope of their response (a minimum of 50 mV/decade increase in K^+ concentration). To minimize the leak current of the headstage in ion sensitive recordings, we used $R_f = 5 \text{ G}\Omega$ and compensated the residual leak current: we zeroed the pipette offset observed with a $10 \text{ M}\Omega$ load, we then switched to a $10 \text{ G}\Omega$ load and we re-zeroed the offset observed in this condition (which is mainly due to the residual leak current) with the current injection circuitry of the amplifier (holding current); the estimated leak current (equal and opposite to the holding current applied) was 0.73 pA at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and stable over time. For accurate evaluation of $[\text{K}^+]_{\text{out}}$ dynamics, the field potential signal was subtracted from the K^+ -sensitive recording (the ion sensitive and the extracellular potential pipettes were placed at $< 100 \mu\text{m}$ of distance from each other). Electrophysiological signals were filtered at 10 kHz and sampled at 25 kHz . Multi-unit activities (MUA) were obtained band-pass filtering off-line the LFP trace at $300\text{-}500 \text{ Hz}$ with pClamp (single pole RC filters). Intrinsic optical signal (IOS: near-infrared light transmittance) (Holthoff & Witte, 1996) was monitored acquiring images with a CoolSnap ES2 CCD camera controlled with micromanager (Edelstein, Tsuchida et al., 2014) at 1 image/s (unless otherwise indicated); note that videos in supplementary material are presented at 5 to 50 image/s. The infrared filter of the microscope, besides for patch-clamp experiments, was used to eliminate the blue light of the optogenetic illumination from the recordings and to obtain near-infrared IOS. Analyses and signal/image processing were performed using pClamp 10.3, Origin 8 (Origin Lab, USA) and ImageJ-Fiji (Schindelin, Rueden et al., 2015).

Optogenetic illumination of brain slices.

Activation of ChR2 was obtained illuminating brain slices through the 4x objective. A white light source (130 W mercury lamp, Intensilight, Nikon, Japan) was connected to the epi-illumination port of the microscope with a light guide containing a 420 nm UV blocker filter (series 2000, Lumatec, Germany); the white light was filtered with a 475/50 filter (Semrock) placed in the optical path and delivered to the objective with a FF685-Di02 dichroic beamsplitter (Semrock). The area of illumination was 38.5 mm². We measured the light power with a power meter (Ophir Photonics, USA), obtaining a power density of 2.8 mW/mm² at the slice surface (photodetector placed at the level of the slice). For spatial illumination experiments, the light guide was connected to a digital micromirror device (DMD)-based patterned photostimulator (Polygon 400, Mightex, Canada), which was connected to the microscope with a custom adapter and a NI-FLT6 Epi-fluorescence Cube Turret equipped with a FF685-Di02 dichroic beamsplitter and a 475/50 filter. The area of the spatial illumination was between 0.34 and 1.1 mm². ON/OFF of the illumination was controlled with the shutter of the Intensilight or with the Polygon 400 software. We mainly used continuous illumination, but trains of illumination have been also successfully tested (with spatial illumination: 5 Hz, duty cycle 50 %; see supplementary video 4).

Induction of CSD by application of KCl.

Cortical spreading depression was induced by brief puffs of KCl (130 mM) in the superficial cortical layers (layers 1-3) with a glass micropipette (2-4 M Ω) connected to an air pressure injector (holding pressure: < 1 PSI, injection pressure: 7 to 10 PSI; PV820 Pneumatic Picopump, WPI, USA). The field potential recording pipette was placed at least 500 μ m away from the CSD induction area. For CSD induction with a solution containing 12 mM KCl (12 mM KCl, 125 mM NaCl, negative control solution was 137 mM NaCl saline

solution), long local perfusions of KCl were performed with a glass pipette of 0.5 M Ω (3 PSI) until CSD induction. For both brief puffs and long local perfusions, Fastgreen (0.1 %, SIGMA-Aldrich, USA) was added to the pipette solutions to visualize the injection area. Application of the control NaCl solutions with Fastgreen never ignited CSD.

Image processing and analyses.

Image analysis with ImageJ-Fiji was used for identifying the CSD wave by intrinsic optical imaging. Image processing was performed to evaluate latency of CSD initiation and to quantify CSD propagation speed with a custom made macro (available at <https://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/scripts/imagej.htm>): to eliminate the background and isolate the wave from the raw image, a representative image acquired before the 470 nm illumination was subtracted from the others and then contrast was enhanced. To determine the speed of the propagating wave, successive line plots of the wave front from processed images (every 2 s) were drawn and the spatial distances between them were quantified by means of the peak finder ImageJ plugin. For each slice, speed was estimated on a minimum of 4 time points (8 s). For few experiments, the quality of the images was not sufficient for a reliable quantification of CSD propagation speed, and they were considered as "non-available" (NA) data (reported in the supplementary table). Latencies of CSD initiation were quantified off-line using processed images. Only CSDs that initiated in the visual field of the camera were used for latency analysis; we considered the others as "non-available" data (see the supplementary table).

For the evaluation of the percentage of CSD induction, individual slices were exposed to 470 nm illumination for 90 s maximum. When the illumination did not induce CSD within this time limit, we tested that the slice could generate CSD by injecting a puff of 130 mM KCl solution as described above. The percentage of optogenetically induced CSD was quantified considering as non-successful optogenetic inductions only experiments in which the slice could generate CSD with a subsequent application of KCl. The same

protocol was used to determine the success rate of spontaneous CSD induction following bath application of Hm1a toxin: individual slices from VGAT-ChR2 mice were perfused with rACSF or with Hm1a (10 nM) dissolved in rACSF for 10-15 min. If no CSD occurred in this time window, then optogenetic CSD induction was tested. The percentage of CSD triggered following Hm1a was quantified considering as non-successful inductions experiments in which the slice could generate CSD with a subsequent 470 nm illumination. "Aborted CSD" refers to CSD that rapidly decelerate after initiation and stop propagating within <800 μm from the initiation site.

Immunohistochemistry, confocal acquisitions, and cell count.

Mice were anesthetized (disodium salt pentobarbital, 40 mg/kg, IP) and intracardially perfused with cold PBS (Sigma-Aldrich, USA) and paraformaldehyde 4 % (Electron Microscopy Sciences, USA) prepared in PBS. Brains were removed and post-fixed overnight. 40 μm -coronal sections were performed with a microtome (HM650V, Microm, Germany). Before immunohistochemistry processing, floating sections were permeabilized and immunoblocked with Triton X-100 (0.1 %, Sigma-Aldrich, USA), NGS (10 %, Normal Goat serum, S-1000, Vector lab, USA), BSA (0.5 %, Bovine serum albumin, Amresco, USA) diluted in PBS, at RT for 30 min. Then, slices were incubated overnight at 4 °C with primary antibody, and after several washes at RT, with the appropriated secondary antibody. Antibodies were diluted in PBS containing Triton X-100 (0.1 %), NGS (1 %), BSA (0.5 %). Slices were mounted on glass slides using Fluoroprep (Biomérieux, France) or Mowiol (Sigma Aldrich, USA) as mounting media. All antibodies used in the study are commercially available and have been validated in previous published studies, as reported by the suppliers.

Primary antibodies used: anti-NeuN (1/1000) mouse monoclonal antibody (MAB377, Merck Millipore, USA), anti-CamKII (1/100) mouse monoclonal antibody (6G9 clone, MA1-048, ThermoFischer Scientific, USA), anti-S100 (1/1000) rabbit polyclonal antibody

(Z0311, Dako Corp., USA). Fluorescent dye-conjugated secondary antibodies used in appropriate combinations: Goat-anti mouse or anti-rabbit antibodies (1/1000: Alexa 647, A21236 and A21245, Invitrogen, USA).

Immunofluorescence acquisitions were performed using an confocal laser-scanning microscope FV10i (Olympus, Japan), with a 60x objective (image format: 1024x1024). Mosaics of ~1.5 mm x 1.5 mm were performed with 635 nm and 559 nm laser lines. Quantification of fluorescent cells and co-localisation of fluorescent markers were performed with ImageJ-Fiji and the cell counter plugin, using 200 µm-width regions of interest (ROI) drawn perpendicularly to the cortical surface and covering all the cortical layers. 4-5 ROI were used for each mouse and the grand average was then performed with 3 mice (Suppl.FigS1).

Patch-clamp recordings in cell-lines.

Plasmids, cell culture and transfections. The cDNAs of the Nav1.1 Na⁺ channel (GenBank sequence NM_006920.4) and of the Nav1.2 Na⁺ channel (GenBank sequence NM_021007) were obtained under a MTA from Jeff Clare (Glaxo-SmithKline, UK) and subcloned into the pCDM8 vector to reduce rearrangements, as already described (Bechi, Scalmani et al., 2012, Cestele et al., 2013b). The plasmids was propagated in MC1061/P3 *E. Coli* (Invitrogen-ThermoFisher, USA) grown at 28 °C for > 48 h, and the entire coding sequence was sequenced after each propagation to rule out the presence of unwanted spurious mutations or rearrangements. Nav1.1 or Nav1.2 were co-expressed with a reporter vector expressing YFG (pEYFP-N1) in tsA-201 cells (authenticated cells purchased from ECACC-Sigma: cell line 96121229) transiently transfected by using the CaPO₄ method, as previously described (Bechi et al., 2012, Cestele et al., 2013b); tsA-201 cells were cultured in modified Dulbecco's medium and Hams-F12 mix supplemented with 10 % fetal bovine serum (Invitrogen-ThermoFisher, USA). Nav1.6 Na⁺ channel (GenBank sequence NM_014191.2) was stably expressed in HEK293 cells (Bechi et al.,

2012, Oliveira, Redaelli et al., 2004) (obtained under a MTA from Jeff Clare, Glaxo-SmithKline, UK), which were cultured in modified Dulbecco's medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (Invitrogen-ThermoFisher, USA). Cell cultures were tested for mycoplasma contamination (LookOut kit, Sigma-Aldrich).

Whole-cell recordings and analysis. Sodium currents were recorded with the whole-cell configuration of the patch-clamp technique (24-48 h after transfection for Nav1.1 and Nav1.2) as previously described (Bechi et al., 2012, Cestele et al., 2013b). The recordings were performed at room temperature (22-25°C) using a Multiclamp 700A amplifier and pClamp 10.2 software (Axon Instruments/Molecular Devices). Signals were filtered at 10 kHz and sampled at 100 kHz. Electrode capacitance and series resistance were carefully compensated throughout the experiment. Pipette resistance was between 1.5 and 2.5 MΩ; maximum accepted voltage-clamp error was 2.5 mV. The remaining transient and leakage currents were eliminated online using a P/4 subtraction paradigm. The extracellular recording solution contained (in mM): 150 NaCl, 10 HEPES, 2 KCl, 1.5 CaCl₂ and 1 MgCl₂ (pH 7.4 with CsOH); the internal pipette solution contained (in mM): 105 CsF, 35 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7.4 with CsOH).

Pharmacological agents and chemicals.

Gabazine, Isoguvacine and CdCl₂ were bought from Sigma-Aldrich (USA), CNQX disodium salt, VU0240551 and VU0463271 from Tocris Bioscience (UK), CPP and TTX-citrate from Alomone labs (Israel). Synthetic Hm1a was purchased from Smartox S.A.S (France). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. Drugs were applied for 15 min before to test the induction of CSD.

In vivo experiments.

Mice were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (100 mg/kg and 5 mg/kg,

respectively) and placed in a Faraday cage-shielded stereotaxic frame. Supplemental doses of anesthesia were applied on appearance of withdrawal reflex in response to limb pinching. The body temperature was maintained at 37 °C with a heating pad; the stability of the respiratory activity was monitored with a piezoelectric transducer (MLT1010 Pulse Transducer, AD Instruments, UK) and that of the heart rate with ECG recordings. A craniotomy was performed (2 mm antero-posterior, 3.5 mm lateral with respect to bregma), the dura was carefully removed, and mineral oil (Sigma-Aldrich) was applied on the cortex to prevent cortical surface drying. A glass pipette filled with 0.9 % NaCl (1-2 μm tip diameter, Ag/AgCl electrode) was lowered into the barrel cortex for DC field potential recordings. The placement of the pipette in the barrel cortex was confirmed recording the spiking activity induced by vibrissae stimulations. A 400 μm diameter optical fiber, connected to a 470 nm LED light source (Optoflash, Cairn research, UK; 30 mW/mm^2 at the optical fiber tip) was placed on the surface of the cortex, in the area of the recording pipette. The photostimulations consisted of 100 Hz trains of 0.8 ms pulses, delivered till a CSD was triggered; after 100 s the stimulation was considered unsuccessful. Note that trains of illumination were able to induce CSD also in brain slices (supplementary video 4), DC field potentials were recorded with a differential extracellular amplifier (EX4-400, Dagan, USA) and acquired with a Digidata 1440A and pClamp software (Molecular Devices, USA). Anesthetized mice were sacrificed at the end of the recordings by cervical dislocation.

Statistical analysis

For experiments with mice, we used data pooled from at least 3 animals per condition (including negative controls) to ensure reproducibility of results. No precise sample-size calculation was performed; sample sizes were equal or larger than that of other publications that have used the same techniques. We did not use randomization of subjects: mice were used after genotyping and littermates were negative controls. Collection of data was not formally randomized; single cell recordings undergo a practical

randomization because the recorded cells are selected randomly from the available pool. We did not perform blind experiments (genotyping of mice and, in case, systematic tests using a red flashlight were performed before the experiment to confirm the genotyping results). Statistical tests were performed with Origin 8 (OriginLab) and R (18). Fisher's exact test followed by a pairwise test adjusted with Bonferroni correction was performed for the analysis of contingency tables. Two-tailed nonparametric Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test and Friedman ANOVA were performed because groups are not large enough to accurately verify normality and equality of variance. Dunn's nonparametric comparison and Bonferroni correction (comparisons with the control group) were used for post hoc tests when appropriate. The one sample Wilcoxon signed-rank nonparametric one-sided test was used to evaluate the effect of Hm1a on Na⁺ currents in cell lines (fold increase of INaP larger than 0) and the one-sided paired Wilcoxon Signed Rank Test was used for effect of Cd²⁺ on evoked post-synaptic currents. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Overactivation of GABAergic neurons can initiate CSD in brain slices.

To directly investigate the role of GABAergic neurons, we used hemizygous VGAT.cre-ChR2(H134R)tdTomato.lox (VGAT-ChR2) mice, in which tdTomato-tagged channelrhodopsin-H134R is selectively expressed in GABAergic neurons (Suppl.Fig.S1) (Chao et al., 2010). Blue light illumination of the neocortex in coronal brain slices induced CSD, as monitored by both extracellular local field potential (LFP) and intrinsic optical signal (IOS) (Fig.1a-b and Video1). Mean latency to induction was 26.2 ± 1.8 s ($n = 103$) and propagation speed was 3.2 ± 0.1 mm/min ($n = 104$) (Fig.1c). Macroscopic features of CSD induced by optogenetic stimulation were similar to those of CSD triggered by a focal puff of 130 mM KCl (Suppl.Fig.S2 and Video2), a classic model of CSD induction (Pietrobon & Moskowitz, 2014). We performed a subset of experiments for determining the rate of success of optogenetic CSD induction (Fig.1d; see methods for detailed procedure): it was induced in 85 % of VGAT-ChR2 slices and never with control littermates (i.e. slices from VGAT-Cre, ChR2.lox or WT mice). Moreover, CSD was never induced in slices from mice that express ChR2 selectively in parvalbumin positive GABAergic neurons (PV-ChR2, Fig.1d); evidently, hyperactivity of this subpopulation of interneurons alone is not sufficient to trigger CSD. To confirm the specific involvement of GABAergic neurons in CSD induction, we used another mouse line with selective ChR2 expression in all GABAergic neurons (hemizygous cre-lox Dlx5/6-ChR2 mice); these experiments showed that CSD was optogenetically induced also with this line (Fig.1e).

Role of Nav1.1 channels.

To further confirm the causal role of GABAergic neurons and to disclose the role of Nav1.1 channels in the generation of this type of CSD, we used pharmacologic and

genetic tools. The spider toxin Hm1a has been recently reported as a specific Nav1.1 enhancer (Osteen, Herzig et al., 2016). With whole-cell patch-clamp recordings of Na⁺ currents in human cell lines, we first confirmed that also in mammalian cells at low concentration (10 nM) it targets selectively Nav1.1 over the two other Nav isoforms expressed in the adult cortex, Nav1.2 and Nav1.6 (Fig.2a-c). Importantly, the Nav1.1 gain-of-function induced by Hm1a, 12-fold increase of persistent current, was comparable to that previously observed with FHM3 mutations (Cestele et al., 2008, Cestele et al., 2013b). Then, we tested the effect of the toxin in slices from VGAT-ChR2 mice: bath application of 10 nM Hm1a lead to spontaneous CSD ignition in the neocortex (Fig.2d-e; see methods for details). Furthermore, in slices in which CSD was not elicited after 10 min of perfusion with Hm1a, we used optogenetic stimulation to induce CSD, showing that it was facilitated in comparison with controls without Hm1a (latency was reduced 1.38-fold; see Fig.2f). Additionally, to provide further evidence of the specific involvement of GABAergic neurons and Nav1.1 channels in CSD initiation, we crossed VGAT-ChR2 with Nav1.1^{+/-} mice, a Nav1.1 knock-out model of the epileptic encephalopathy Dravet syndrome in which one allele of the *Scn1a* gene is not functional, causing Nav1.1 haploinsufficiency and GABAergic neurons' hypoexcitability (Yu et al., 2006). In brain slices from these mice, the success rate of optogenetic CSD induction was reduced 4.3-fold (Fig.3a and Suppl.Table), showing that Nav1.1 loss of function and reduced excitability of GABAergic neurons can inhibit CSD ignition. Moreover, in a different series of experiments, we found that the success rate of CSD induction in VGAT-ChR2/Nav1.1^{+/-} slices was rescued increasing the extracellular K⁺ concentration ([K⁺]_{out}) to 8 mM (Fig.3b and Suppl.Table). Therefore, these results confirm the key role of Nav1.1 channels and over-activation of GABAergic neurons in this mechanism of CSD induction. They also show that even a moderate increase of [K⁺]_{out} can have an important role in this mechanism of CSD induction.

Mechanism of initiation.

Hyperactivity of GABAergic neurons can favor neuronal network excitation by various mechanisms, including synaptic transmission-driven activation of neuron-glia networks or accumulation of K^+ in the extracellular space induced by action potential discharges (Kaila, Price et al., 2014, Perea, Gomez et al., 2016, Shiri, Manseau et al., 2016). We performed pharmacological experiments to disclose the detailed mechanism linking hyperactivity of GABAergic neurons to CSD initiation. In particular, the K^+ - Cl^- cotransporter KCC2 can induce post-synaptic K^+ efflux and is involved in excitatory actions of GABAergic transmission leading to hyperexcitability (Kaila et al., 2014). However, selective KCC2 inhibitors did not modify the success rate and dynamics (latency, propagation speed) of CSD induced by optogenetic stimulation, not even upon pre-treatment of slices with the GABA-A receptor agonist isoguvacine that we used to increase KCC2 baseline activity (Suppl.Table). Further, we tested blockers of neuronal excitability or synaptic transmission. The Na^+ channel/action potential blocker tetrodotoxin (TTX) completely suppressed CSD induction (Fig.3c), whereas the block of glutamate (Kainate-AMPA-NMDA) and/or GABA-A receptors (with CNQX-CPP and gabazine, respectively), or the complete block of synaptic transmission with the Ca^{2+} channel blocker Cd^{2+} (Fig.3c, Suppl.Fig.S3, Suppl.Table) did not modify the success rate of CSD induction. Notably, neurotransmission, in particular glutamatergic one, was instead important for sustaining CSD propagation, because in the presence of CNQX-CPP or Cd^{2+} , the speed of CSD propagation was reduced and the propagation often aborted (Table). Altogether, these results demonstrate that GABAergic neurons' hyperexcitability is sufficient for CSD initiation in the neocortex, and that synaptic transmission-driven mechanisms are not necessary, although they are implicated in propagation. Also, they suggest that the mechanism of initiation could involve spike-generated $[K^+]_{out}$ increase.

To disclose whether spike-generated $[K^+]_{out}$ increase was directly involved in CSD initiation, we first evaluated the $[K^+]_{out}$ dynamics during optogenetic illumination, measuring $[K^+]_{out}$ at the site of CSD initiation with K^+ -sensitive electrode recordings. In order to record from the site of initiation, we used spatial optogenetic illumination to

specifically control the location of CSD induction (Fig.4a-b, Video3). Our data shows that $[K^+]_{out}$ slowly and progressively increased during illumination, reaching ~ 12 mM when CSD was ignited (identified as the end of the multi-unit activity) (Fig.4c-d, Suppl.Fig.S4). This slow increase was not observed in the CSD propagating in the cortical tissue outside the initiation site (Suppl.Fig.S4). However, at CSD ignition, $[K^+]_{out}$ was similar to that observed at the site of initiation (Suppl.Fig.S4). This suggests that, at CSD initiation, $[K^+]_{out}$ can progressively accumulate near neuronal membranes, until CSD ignition threshold is reached. We confirmed this hypothesis by inducing CSD with focal applications of 12 mM KCl in a neocortical area that was similar in size to that of spatial optogenetic illuminations (Fig.4e and Video 5).

Overactivation of GABAergic neurons can initiate CSD *in vivo*.

Finally, to show that overactivation of GABAergic neurons can lead to CSD induction also *in vivo*, we illuminated with an optical fiber the somatosensory cortex of VGAT-ChR2 mice, monitoring CSD by LFP recordings (Fig.5); CSD was induced in 50 % of VGAT-ChR2 mice and never in control littermates. Therefore, this data confirms the results obtained in brain slices with optogenetic stimulations.

Discussion

We have identified and characterized a novel mechanism of CSD initiation implicated in the pathophysiology of migraine, showing in an acute model a causal relationship between initial hyperactivity of GABAergic neurons and CSD ignition, driven by the progressive increase of $[K^+]_{out}$ at the initiation site and in which synaptic transmission is not involved (Fig.6). Notably, CSD was also induced by activation of NaV1.1 with the specific toxin Hm1a (Osteen et al., 2016), and its induction by optogenetic stimulation was inhibited in brain slices from VGAT-ChR2-NaV1.1^{+/-} mice (Yu et al., 2006). This is consistent with the key role of NaV1.1 in GABAergic neurons' excitability and with the effect of FHM3 mutations, which cause gain of function of NaV1.1 and induce an increase of the persistent Na⁺ current similar to that observed with Hm1a (Cestele et al., 2013a, Cestele et al., 2008, Cestele et al., 2013b, Fan et al., 2016, Mantegazza & Cestele, 2017). Notably, in experiments performed with VGAT-ChR2-NaV1.1^{+/-} mice, the loss of function of NaV1.1 inhibited CSD, although CSD is characterized by network hyperexcitability and cortical networks are hyperexcitable in mice carrying loss of function NaV1.1 mutations (Hedrich et al., 2014, Liautard et al., 2013). This further highlights the role of GABAergic neurons in the mechanism of CSD initiation that we have studied, and suggests that specific types of network hyperexcitability are required for different mechanisms of CSD initiation. Thus, GABAergic neurons' hyperactivity can acutely induce CSD in the normal (non-pathologic) neocortex, and, in comparison with possible chronic models (i.e. genetic), this approach demonstrates that other pathologic modifications (e.g. remodeling) are not necessary. This is a novel, previously undisclosed, pathological role of GABAergic neurons.

We have also demonstrated that CSD initiation by GABAergic neurons' hyperactivation is not dependent on synaptic transmission. The manipulations that could inhibit CSD initiation were the generalized block of action potentials' generation (applying TTX) or the reduction of GABAergic neurons' excitability (in brain slices from VGAT-ChR2-NaV1.1^{+/-}

mice). Differently than initiation, CSD propagation was inhibited by blocking Ca^{2+} channel-dependent synaptic release or glutamate receptors, but not by blocking GABA-A receptors. These results show that the increase in GABA-A activation caused by GABAergic neurons' hyperexcitability is not involved in CSD, whereas glutamatergic transmission has an important role in propagation, but not in initiation. Overall, the data is consistent with different mechanisms of initiation and propagation. Optogenetic experiments with spatial illumination (Fig.4 and Suppl.Fig.4) allowed us to investigate the properties of the site of initiation, in which we have observed a progressive $[\text{K}^+]_{\text{out}}$ build up that preceded the fast $[\text{K}^+]_{\text{out}}$ increase associated with CSD ignition, whereas this slow phase of progressive build up was absent in recordings of the propagating CSD outside the initiation area. This highlights that $[\text{K}^+]_{\text{out}}$ dynamics is different in initiation and propagation. Numerous studies have performed pharmacological investigations of mechanisms of CSD triggered with classic methods, revealing a complex picture with results that often are specific for different methods and for initiation vs. propagation (Pietrobon & Moskowitz, 2014), consistent with different cellular/molecular mechanisms. Neuronal firing-induced K^+ build-up is a key factor for CSD ignition by hyperactivation of GABAergic neurons, a novel mechanism of induction involved in FHM3 that is different in comparison with that implicated in models of FHM1 & 2, in which it has been shown that excessive glutamate release/accumulation is the major pathological dysfunction (Capuani et al., 2016, Tottene et al., 2009, Vecchia et al., 2014). A recent optogenetic CSD model of glutamatergic neurons' hyperactivation probably mimics mechanisms at play in FHM1 & 2, including the necessity of NMDA receptor activation for CSD initiation (Chung, Sadeghian et al., 2018).

Consistent with a different mechanism in comparison with FHM3, FHM1 & 2 patients often show complex phenotypes that are more severe than those of FHM3 and include several neurologic/psychiatric co-morbidities, including seizures that herald or are present during hemiplegic migraine attacks (Ferrari et al., 2015, Vecchia & Pietrobon, 2012). In FHM3 there are no patients with these complex phenotypes, and in the few cases in which

seizures have been reported, they are always independent from migraine attacks and do not temporally overlap (Mantegazza & Cestele, 2017). Moreover, migraine is not part of the phenotypes of epileptogenic Nav1.1 mutations, which cause loss of function of the channel and hypoexcitability of GABAergic neurons (Dravet, Bureau et al., 2005, Zhang, Burgess et al., 2017, Zuberi, Brunklaus et al., 2011), consistent with different pathologic mechanisms of epileptogenic and migraine Nav1.1 mutations. Congruously, we have never observed ictal-like epileptiform activities in our experiments, although it has been shown that ictal-like activities generated by application of convulsants in brain slices could be enhanced/induced (Shiri et al., 2016, Yekhleif, Breschi et al., 2015) or, depending on the brain region, inhibited (Ledri, Madsen et al., 2014) by the optogenetic activation of GABAergic neurons. This reflects the requirement of a network that already generates epileptic activities for induction/modulation of these activities by the activation of GABAergic neurons. Nevertheless, it is interesting to note that in those studies different mechanisms of onset (some requiring activation of GABAergic neurons, others activation of glutamatergic neurons) have been identified for epileptiform activities that appear phenomenologically similar (Shiri et al., 2016). This could be the case, as we have shown, also for network activities that lead to CSD induction, which could be specific for different types of migraine, in particular for FHM3 compared to FHM1 & 2.

In our experiments, latencies to CSD induced by activation of GABAergic neurons were of few tens of seconds. In most of the classic experimental models, CSD is induced with strong stimuli (e.g. injections of KCl in the tens of mM to molar range, the latter well beyond pathophysiological limits) (Pietrobon & Moskowitz, 2014), which often result in shorter latencies most likely because they do not reproduce the complete dynamic process of CSD onset at the initiation site, mimicking conditions that are those of the generalized depolarization phase. There is no information about activities of single neurons leading to CSD induction in migraine patients. As in other episodic and paroxysmal disorders (Ptacek, 2015), pathologic dysfunctions of migraine are probably controlled by homeostatic mechanisms in the period between attacks, and different

factors (e.g. hormonal/neuromodulatory changes or increase of incoming neuronal signals from the periphery) may affect neuronal excitability and activities of cortical networks, triggering CSD induction and migraine attacks. It can be hypothesized that, in the restricted volume of cortex in which CSD is initially ignited, these factors could weaken homeostatic controls and hyperexcitable GABAergic neurons could be hyperactivated for tens of seconds, similarly to our acute model. Interestingly, neurons can show early and long lasting increase of activity also in other episodic neurologic disorders, as observed with single unit recordings in epileptic foci of patients (Truccolo, Donoghue et al., 2011), in which increased neuronal activity begins minutes before the attack.

In conclusion, migraine etiology is multifactorial, with probably numerous different mechanisms (Ferrari et al., 2015); we have disclosed a novel mechanism of CSD initiation, linked to FHM3 and possibly implicated also in other types of migraine, because it could be associated not only to Nav1.1 mutations, but also to other dysfunctions that lead to GABAergic neurons' hyperactivity.

- *Tables*
- *Captions* to figures
- *Figures* in individual files and uploaded separately with simple names such as "Figure1," "Fig. 2," or "Figure3_color."
- *Supplementary Material* must be separate from the main document file.

Acknowledgements

We thank Frederic Brau for his skillful expertise on imaging and image processing, Michelle Studer and Pascal Ezan for advices on immunohistochemistry experiments, and Etienne Audinat for insightful discussions.

This research was supported by the Investissements d'Avenir-Laboratory of Excellence "Ion Channels Science and Therapeutics" (grant LabEx ICST ANR-11-LABX-0015-01 to MM), the European Union projects DESIRE (grant n. EFP7-602531 to MM) and the "Fédération Hospitalo-Universitaire" FHU-INOVPAIN. SZ, a Ph.D. student of the "Ecole doctorale 85", was the recipient of a fellowship from the French research Ministry (MENRT).

Author Contribution

Performed experiments and collected data: OC, SZ, AL, MA, SC

Analyzed and interpreted the data: OC, SZ, AL, FD, SC, MM

Designed the experiments: OC, SZ, SC, MM

Prepared the figures: OC, SZ, AL, SC, MM

Wrote the manuscript: OC, MM

Abbreviations.

ChR2: Channelrhodopsin-2

CSD: Cortical Spreading Depression

DC: Direct Current

FHM: Familial Hemiplegic Migraine

IOS: Intrinsic Optic Signal

LFP: Local Field Potential

MA: Migraine with Aura

Na_v: voltage-gated sodium channel

PV: Parvalbumin

VGAT: Vesicular GABA Transporter

References

- Baalman K, Marin MA, Ho TS, Godoy M, Cherian L, Robertson C, Rasband MN (2015) Axon initial segment-associated microglia. *J Neurosci* 35: 2283-92
- Bechi G, Scalmani P, Schiavon E, Rusconi R, Franceschetti S, Mantegazza M (2012) Pure haploinsufficiency for Dravet syndrome Na(V)1.1 (SCN1A) sodium channel truncating mutations. *Epilepsia* 53: 87-100
- Capuani C, Melone M, Tottene A, Bragina L, Crivellaro G, Santello M, Casari G, Conti F, Pietrobon D (2016) Defective glutamate and K⁺ clearance by cortical astrocytes in familial hemiplegic migraine type 2. *EMBO Mol Med* 8: 967-86
- Catterall WA, Kalume F, Oakley JC (2010) Nav1.1 channels and epilepsy. *J Physiol* 588: 1849-59
- Cestele S, Labate A, Rusconi R, Tarantino P, Mumoli L, Franceschetti S, Annesi G, Mantegazza M, Gambardella A (2013a) Divergent effects of the T1174S SCN1A mutation associated with seizures and hemiplegic migraine. *Epilepsia* 54: 927-935
- Cestele 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 Nav1.1 (SCN1A) Na⁺ channel. *J Neurosci* 28: 7273-7283
- Cestele S, Schiavon E, Rusconi R, Franceschetti S, Mantegazza M (2013b) Nonfunctional Nav1.1 familial hemiplegic migraine mutant transformed into gain of function by partial rescue of folding defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 17546-51
- Chao HT, Chen H, Samaco RC, Xue M, Chahrouh M, Yoo J, Neul JL, Gong S, Lu HC, Heintz N, Ekker M, Rubenstein JL, Noebels JL, Rosenmund C, Zoghbi HY (2010) Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* 468: 263-9
- Chever O, Djukic B, McCarthy KD, Amzica F (2010) Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J Neurosci* 30: 15769-77
- Chung DY, Sadeghian H, Qin T, Lule S, Lee H, Karakaya F, Goins S, Oka F, Yaseen MA, Houben T, Tolner EA, van den Maagdenberg A, Whalen MJ, Sakadzic S, Ayata C (2018) Determinants of Optogenetic Cortical Spreading Depolarizations. *Cereb Cortex*

De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, Ballabio A, Aridon P, Casari G (2003) Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *NatGenet* 33: 192-196

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

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

Edelstein AD, Tsuchida MA, Amodaj N, Pinkard H, Vale RD, Stuurman N (2014) Advanced methods of microscope control using muManager software. *J Biol Methods* 1

Fan C, Wolking S, Lehmann-Horn F, Hedrich UB, Freilinger T, Lerche H, Borck G, Kubisch C, Jurkat-Rott K (2016) Early-onset familial hemiplegic migraine due to a novel SCN1A mutation. *Cephalalgia* 36: 1238-1247

Ferrari MD, Klever RR, Terwindt GM, Ayata C, van den Maagdenberg AM (2015) Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. *Lancet Neurol* 14: 65-80

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

Hedrich UB, Liautard C, Kirschenbaum D, Pofahl M, Lavigne J, Liu Y, Theiss S, Slotta J, Escayg A, Dihne M, Beck H, Mantegazza M, Lerche H (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* 34: 14874-89

Holthoff K, Witte OW (1996) Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. *J Neurosci* 16: 2740-9

Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J (2014) Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 15: 637-54

Ledri M, Madsen MG, Nikitidou L, Kirik D, Kokaia M (2014) Global optogenetic activation of inhibitory interneurons during epileptiform activity. *J Neurosci* 34: 3364-77

Leo L, Gherardini L, Barone V, De Fusco M, Pietrobon D, Pizzorusso T, Casari G (2011) Increased susceptibility to cortical spreading depression in the mouse model of familial hemiplegic migraine type 2. *PLoS Genet* 7: e1002129

Li Y, Zhong W, Wang D, Feng Q, Liu Z, Zhou J, Jia C, Hu F, Zeng J, Guo Q, Fu L, Luo M (2016) Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. *Nat Commun* 7: 10503

Liautard C, Scalmani P, Carriero G, de Curtis M, Franceschetti S, Mantegazza M (2013) Hippocampal hyperexcitability and specific epileptiform activity in a mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia* 54: 1251-61

Madisen L, Mao T, Koch H, Zhuo JM, Berenyi A, Fujisawa S, Hsu YW, Garcia AJ, 3rd, Gu X, Zanella S, Kidney J, Gu H, Mao Y, Hooks BM, Boyden ES, Buzsaki G, Ramirez JM, Jones AR, Svoboda K, Han X et al. (2012) A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat Neurosci* 15: 793-802

Mantegazza M, Cestele S (2017) Pathophysiological mechanisms of migraine and epilepsy: Similarities and differences. *Neurosci Lett* 667: 92-102

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(v)1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation. *JNeurosci* 27: 5903-5914

Oliveira JS, Redaelli E, Zaharenko AJ, Cassulini RR, Konno K, Pimenta DC, Freitas JC, Clare JJ, Wanke E (2004) Binding specificity of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 sodium channels: unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop. *JBiolChem* 279: 33323-33335

Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene *CACNL1A4*. *Cell* 87: 543-552

Osteen JD, Herzig V, Gilchrist J, Emrick JJ, Zhang C, Wang X, Castro J, Garcia-Caraballo S, Grundy L, Rychkov GY, Weyer AD, Dekan Z, Undheim EA, Alewood P, Stucky CL, Brierley SM, Basbaum AI, Bosmans F, King GF, Julius D (2016) Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain. *Nature* 534: 494-9

Perea G, Gomez R, Mederos S, Covelo A, Ballesteros JJ, Schlosser L, Hernandez-Vivanco A, Martin-Fernandez M, Quintana R, Rayan A, Diez A, Fuenzalida M, Agarwal A, Bergles

DE, Bettler B, Manahan-Vaughan D, Martin ED, Kirchhoff F, Araque A (2016) Activity-dependent switch of GABAergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. *Elife* 5

Pietrobon D, Moskowitz MA (2014) Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci* 15: 379-93

Ptacek LJ (2015) Episodic disorders: channelopathies and beyond. *Annu Rev Physiol* 77: 475-9

Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW (2015) The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* 82: 518-29

Shiri Z, Manseau F, Levesque M, Williams S, Avoli M (2016) Activation of specific neuronal networks leads to different seizure onset types. *Ann Neurol* 79: 354-65

Tottene A, Conti R, Fabbro A, Vecchia D, Shapovalova M, Santello M, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Pietrobon D (2009) Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)2.1 knockin migraine mice. *Neuron* 61: 762-73

Truccolo W, Donoghue JA, Hochberg LR, Eskandar EN, Madsen JR, Anderson WS, Brown EN, Halgren E, Cash SS (2011) Single-neuron dynamics in human focal epilepsy. *Nat Neurosci* 14: 635-41

van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, Cesetti T, van de Ven RC, Tottene A, van der KJ, Plomp JJ, Frants RR, Ferrari MD (2004) A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 41: 701-710

Vecchia D, Pietrobon D (2012) Migraine: a disorder of brain excitatory-inhibitory balance? *Trends Neurosci* 35: 507-20

Vecchia D, Tottene A, van den Maagdenberg AM, Pietrobon D (2014) Mechanism underlying unaltered cortical inhibitory synaptic transmission in contrast with enhanced excitatory transmission in Ca2.1 knockin migraine mice. *Neurobiol Dis* 69C: 225-234

Wagnon JL, Mahaffey CL, Sun W, Yang Y, Chao HT, Frankel WN (2011) Etiology of a genetically complex seizure disorder in Celf4 mutant mice. *Genes Brain Behav* 10: 765-77

Wang B, Wang Z, Sun L, Yang L, Li H, Cole AL, Rodriguez-Rivera J, Lu HC, Zheng H (2014) The amyloid precursor protein controls adult hippocampal neurogenesis through GABAergic interneurons. *J Neurosci* 34: 13314-25

Yekhlef L, Breschi GL, Lagostena L, Russo G, Taverna S (2015) Selective activation of parvalbumin- or somatostatin-expressing interneurons triggers epileptic seizurelike activity in mouse medial entorhinal cortex. *J Neurophysiol* 113: 1616-30

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

Zhang YH, Burgess R, Malone JP, Glubb GC, Helbig KL, Vadlamudi L, Kivity S, Afawi Z, Bleasel A, Grattan-Smith P, Grinton BE, Bellows ST, Vears DF, Damiano JA, Goldberg-Stern H, Korczyn AD, Dibbens LM, Ruzzo EK, Hildebrand MS, Berkovic SF et al. (2017) Genetic epilepsy with febrile seizures plus: Refining the spectrum. *Neurology* 89: 1210-1219

Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, Reavey E, Duncan J, Forbes GH (2011) Genotype-phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. *Neurology* 76: 594-600

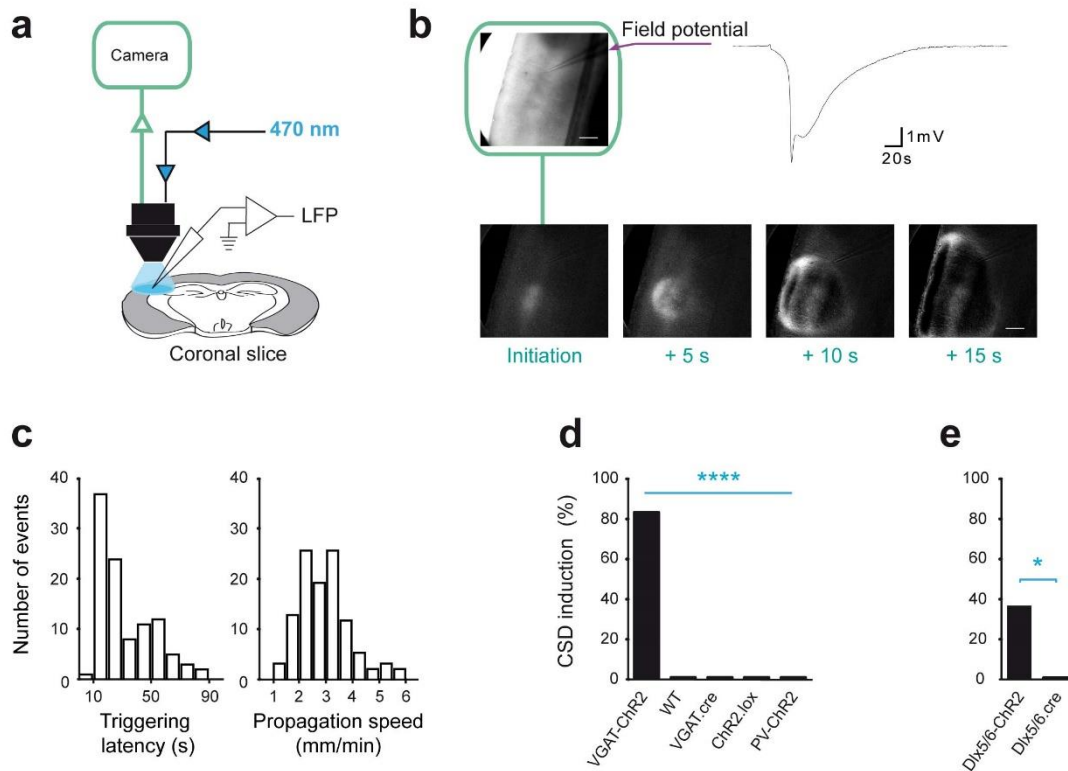


Figure 1. CSD can be triggered by hyperactivity of GABAergic interneurons and Nav1.1, and is not dependent on synaptic transmission. (a) For optogenetic CSD induction, the neocortex in brain slices was illuminated with 470 nm blue light delivered with the 4x objective; CSD was measured with both extracellular local field potential (LFP) and intrinsic optical signal (IOS). (b) Representative CSD induced by 470 nm illumination, revealed by both a negative DC shift in the LFP and IOS. The 4 time series panels correspond to image processing of IOS images (see methods). Scale bar: 250 μ m. (c) Distributions of latencies (median = 19 s, n = 103 slices) and propagation speed (median = 3.18 mm/min, n = 104 slices) of optogenetic CSD in VGAT-ChR2 cortical slices. (d) Success rate of optogenetic CSD in slices from VGAT-ChR2 (11/13 slices), WT (0/14), VGAT.Cre (0/10), ChR2.lox (0/10), PV-ChR2 (0/14) (Fischer's exact test, **** p = 6.7e-10). (e) Success rate of optogenetic CSD in slices from Dlx5/6-ChR2 (7/19) and littermates Dlx5/6-Cre (0/15) (Fischer's exact test, * p = 0.0353).

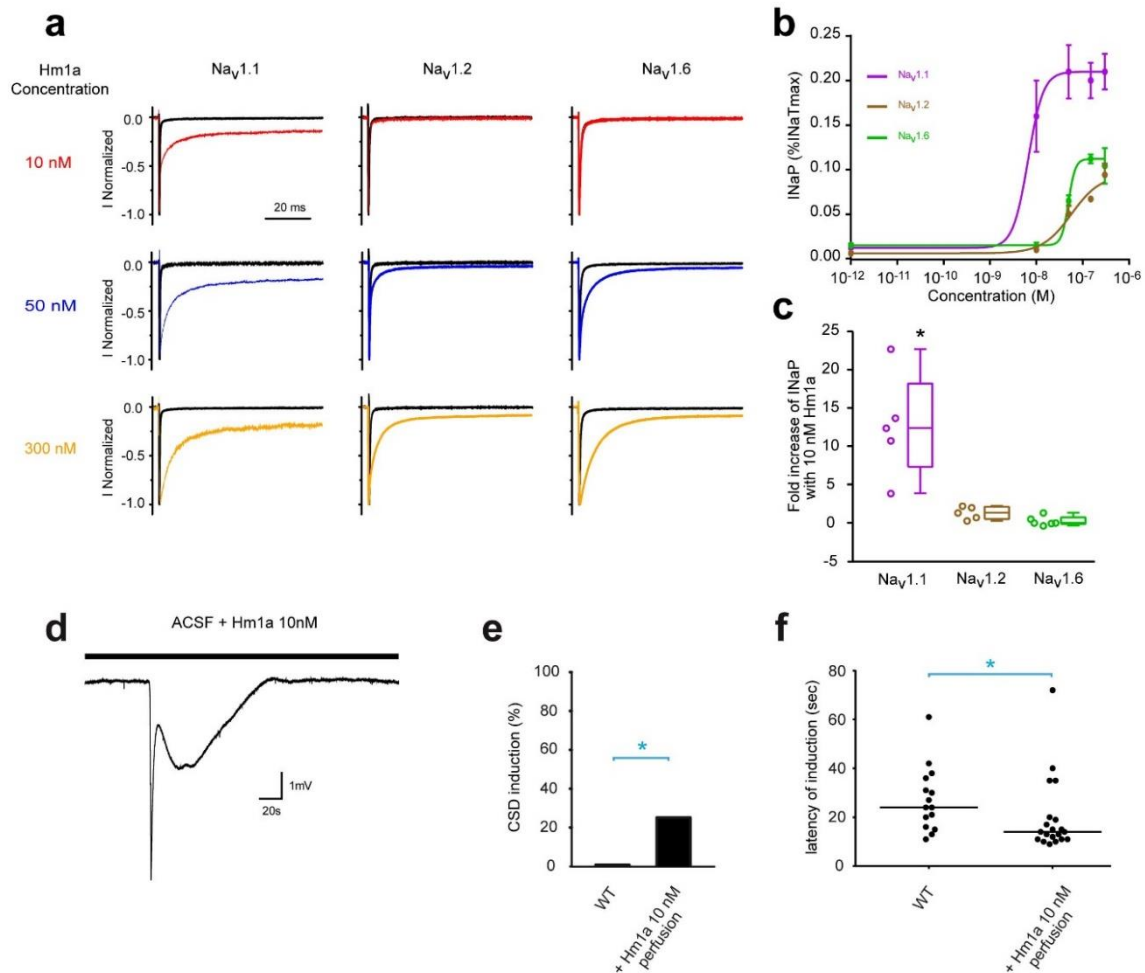


Figure 2. CSD can be triggered by hyperactivity of Nav1.1 induced by a specific enhancer, the toxin Hm1a. (a) Representative whole-cell patch-clamp recordings of sodium currents evoked in human cell lines with 100 ms depolarizing steps to -10 mV from a holding potential of -100 mV in tsA-201 cells expressing Nav1.1, Nav1.2, or Nav1.6 in control condition or in the presence of 10, 50 or 300 nM Hm1a. (b) Dose-response of Hm1a effects on Nav channels, which was quantified measuring the persistent current (I_{NaP}); I_{NaP} , expressed as % of maximal transient peak Na^+ current (I_{NaTmax}) is plotted vs toxin concentrations. Apparent EC_{50} s (efficacy concentration at 50% of maximum effect) for Nav1.1, Nav1.2 and Nav1.6 are 3 nM ($n = 5$ cells), 53 nM ($n = 5$ cells) and 41 nM ($n = 6$ cells) respectively. Note the selective enhancing effect of 10 nM Hma1 on Nav1.1 currents over Nav1.2 and Nav1.6 channels. Notably, Hma1 is not selective for Nav1.1 at higher concentrations. (c) Quantification of the effect of 10 nM Hm1a displayed as fold increase of I_{NaP} , showing that Hm1a is selective towards Nav1.1 over Nav1.2 and Nav1.6 isoforms. Whiskers box-chart plots represent minimum and maximum. One-sided one sample Wilcoxon Signed Rank Test, * $p = 0.029$. (d) Representative LFP recording of a CSD generated spontaneously in the neocortex of VGAT-ChR2 slices during incubation with ACSF + Hm1a 10 nM. (e) Lack of spontaneous CSD in VGAT-ChR2 slices in control (0/15 slices) and success rate with bath-application of 10 nM Hm1a (7/27) (Fischer's exact test, * $p < 0.038$); (f) latency to optogenetic CSD ignition, measured analyzing IOS data (not shown), was reduced with Hm1a in slices in which it was not directly induced by the toxin (19.8 ± 3.4 s Hm1a, $n = 20$; 27.3 ± 3.4 s $n = 15$, control; mean \pm SEM; Mann-Whitney test, $p = 0.015$).

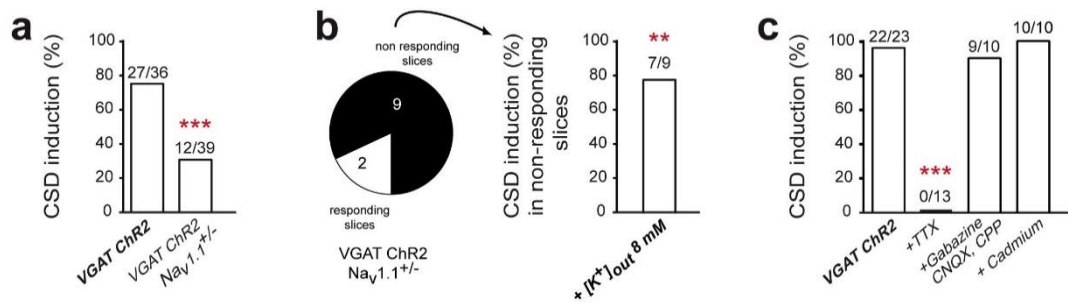


Figure 3. Effect of reduction of GABAergic neurons' excitability, block of neuronal excitability or synaptic transmission on optogenetic CSD induction. (a) Success rate of optogenetic CSD induction in slices from VGAT-ChR2-Nav1.1^{+/-} mice vs. VGAT-ChR2 littermates (***) $p = 0.0002$, Fischer's exact test), and **(b)**, in a different series of experiments, after [K⁺]_{out} increase to 8 mM in VGAT-ChR2-Nav1.1^{+/-} slices in which optogenetic CSD was previously not induced with standard [K⁺]_{out} (***) $p = 0.002$ Fischer's exact test). **(c)** Success rate of optogenetic CSD in VGAT-ChR2 slices perfused with a Na⁺ channel blocker (TTX-1 μ M), with GABA-A and NMDA-AMPA-Kainate receptor antagonists (Gabazine-15 μ M, CPP-10 μ M, CNQX-20 μ M), or with a Ca²⁺ channel blocker (Cd²⁺ 100 μ M) to fully block synaptic release. Fisher's exact test (**** $p = 1.4e-11$); Bonferroni-corrected post-test (***) $p < 0.0001$).

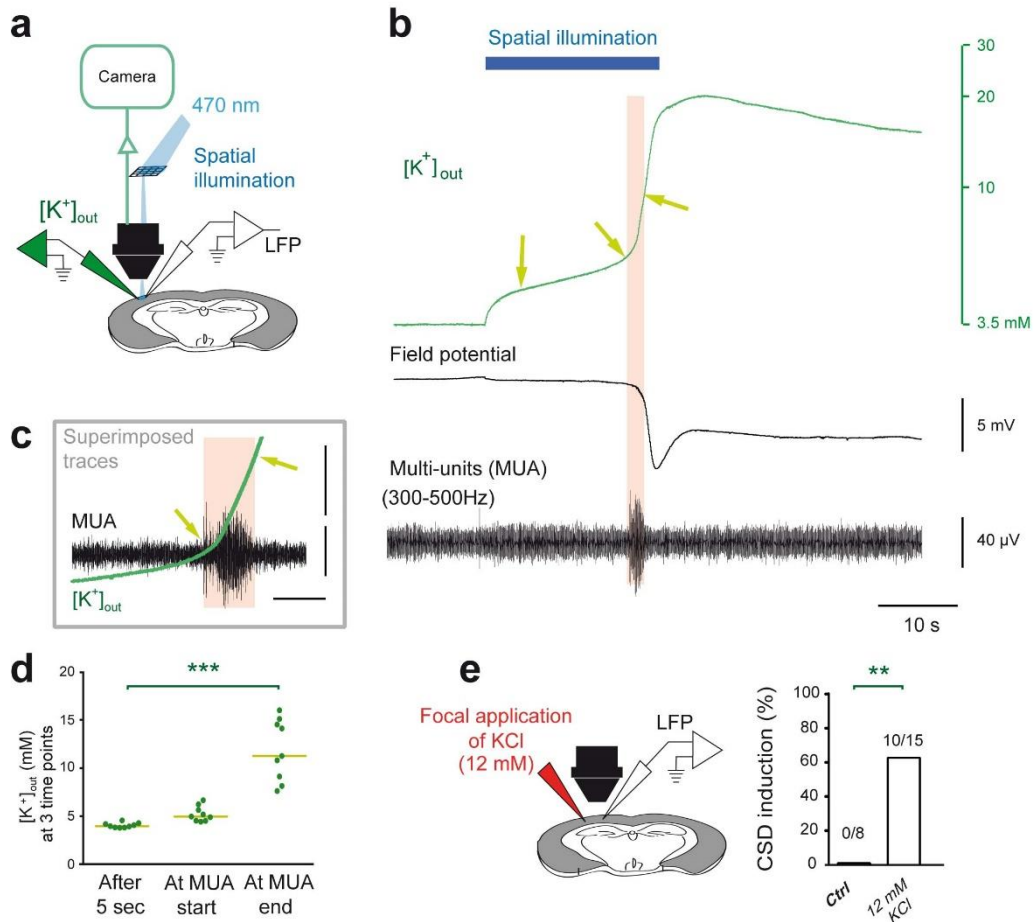


Figure 4. Spike-induced increased $[K^+]_{out}$ is directly involved in CSD induction by spatial illumination. (a-d) Spatial illumination used to specifically control the area of CSD induction, with $[K^+]_{out}$, LFP and IOS recordings at the site of CSD initiation. (b) $[K^+]_{out}$ dynamics before and during CSD, correlated to the LFP and multi-unit activities (MUA), which were paroxysmal at CSD initiation. Only the first component of the CSD is shown. (c) Enlargement and superposition of $[K^+]_{out}$ and MUA traces shown in (b). (d) Quantifications of $[K^+]_{out}$ after 5sec of illumination, when paroxysmal MUA firing begins and ends (beginning of the depolarized block) (arrows in b and c), $n = 9$ slices. Bars represent medians. Friedman test ($p < 0.0001$) and Dunn's post-test (***) $p < 0.001$. (e) Success rate of CSD induced by long-lasting puff of 12 mM KCl (dissolved in 125 mM NaCl) or 137 mM NaCl solution (Ctrl; Fisher exact test, ** $p = 0.0027$). Injection area: 0.75 ± 0.11 mm² ($n = 10$ slices with successful CSD inductions).

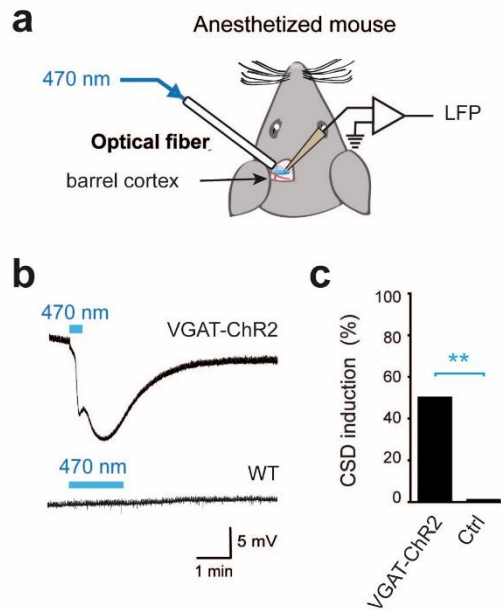


Figure 5. Optogenetic CSD induction *in vivo*. (a) Experimental design: blue light optogenetic stimulation was applied to the barrel cortex of anesthetized mice with an optical fiber through a craniotomy; DC field potential recordings were performed with a glass pipette (Ag/AgCl electrode). (b) Representative field potential traces of CSD in a VGAT-ChR2 mouse and no response in a WT mouse. (c) Proportion of optogenetic CSD induction in VGAT-ChR2 (5/10) and control mice (0/13, including WT, N = 5, VGAT.Cre, N = 4, and ChR2.lox N = 4. Fischer's exact test; ** p = 0.0075).

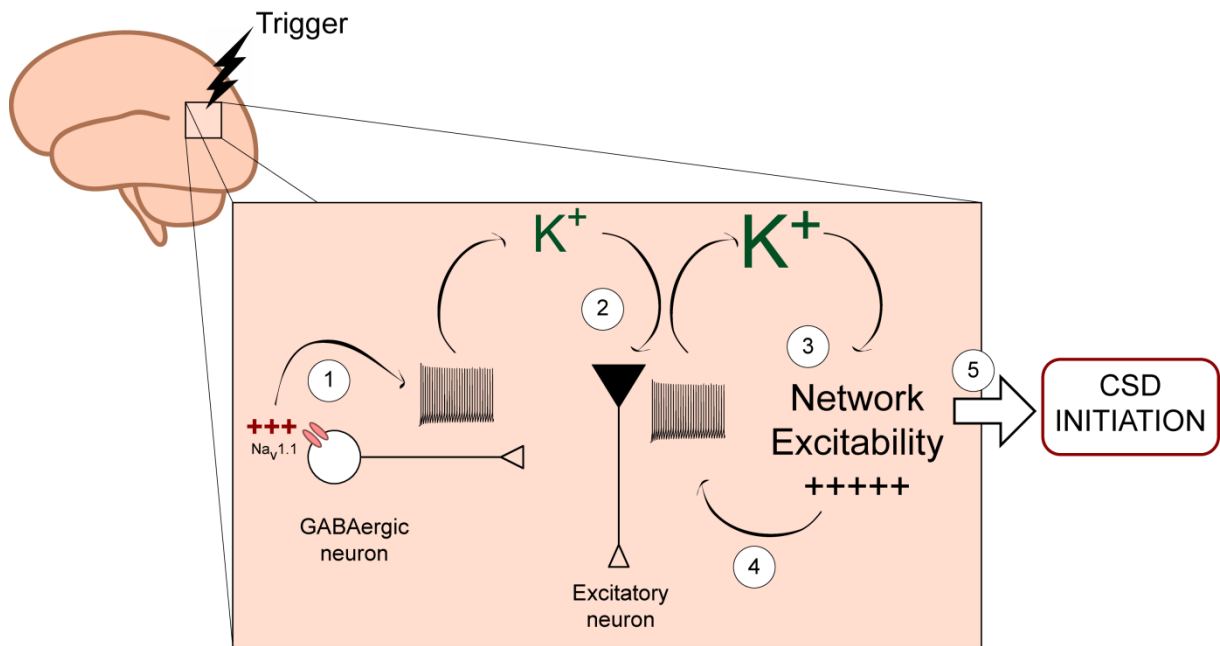


Figure 6. Diagram of the novel mechanism of CSD initiation. GABAergic neurons' hyperactivity and intense firing (1) caused by pathologic dysfunctions (e.g. Nav1.1 gain of function) can lead to spiking-induced accumulation of extracellular K⁺ which increases the excitability of excitatory neurons (2), then induces a critical build-up of extracellular K⁺ (3) that drives the network to hyperexcitability (4) and eventually induces depolarization block and CSD initiation (5), independently from synaptic transmission. This mechanism can be associated not only to gain of function Nav1.1 mutations, but possibly also to other dysfunctions that induce GABAergic neurons' hyperactivity. As in all episodic disorders, homeostatic mechanisms can control dysfunctions in the period between the attacks, but triggering factors (e.g. hormonal/neuromodulatory changes or increase of incoming neuronal signals from the periphery) may focally affect neuronal excitability and activities of cortical networks, leading to long lasting GABAergic neurons' hyperexcitability and CSD induction.

Success rate (%)

	Ctrl	GABAZINE	CPP CNQX	CPP CNQX GABAZINE	CADMIUM	TTX
n	38/39 (97%)	6/6 (100%)	16/16 (100%)	9/10 (90%)	10/10 (100%)	0/13 (0%)
Statistics	Fisher's exact test p=4.1e-14					
Pairwise test adjusted with Bonferroni correction		NS	NS	NS	NS	<0.0001 (**)

Propagation speed of CSD (mm/min)

	Ctrl	GABAZINE	CPP CNQX	CPP CNQX GABAZINE	CADMIUM
n	30	6	16	9	10
Mean	3.57	5.08	1.51	2.97	1.03
S.E.M	0.18	0.44	0.11	0.21	0.13
Median	3.45	5.28	1.39	2.66	0.90
NA	0	0	0	0	0
Statistics	Kruskal-wallis p<0.0001				
Dunn's multiple comparison test		NS	<0.0001 (****)	NS	<0.0001 (****)

Latency of CSD induction (in seconds)

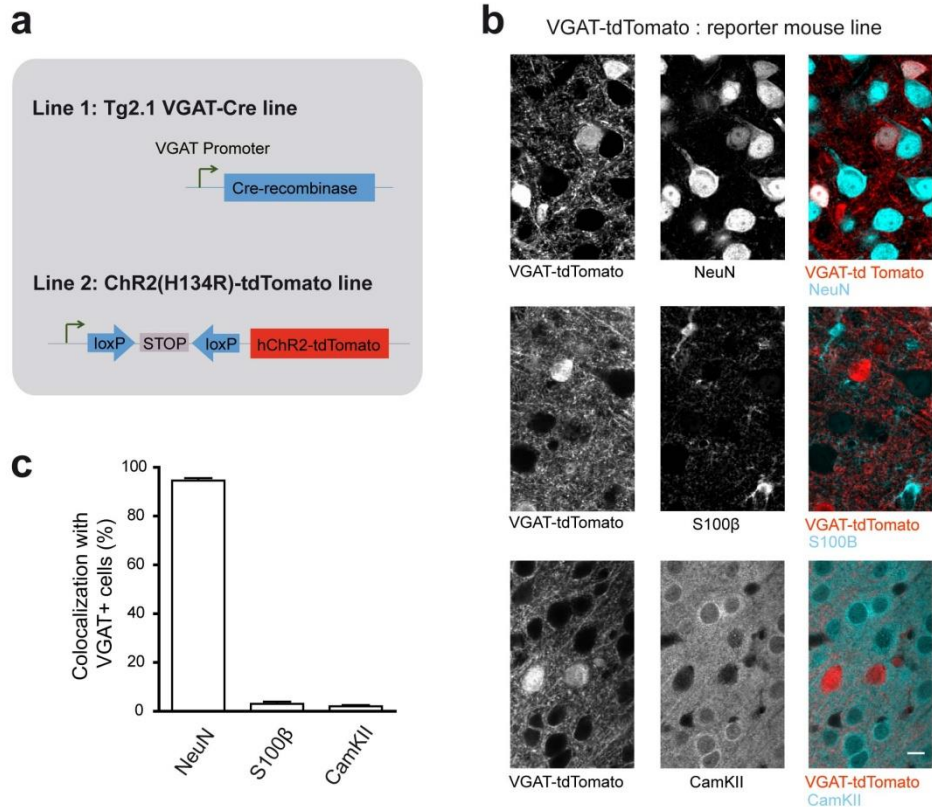
	Ctrl	GABAZINE	CPP CNQX	CPP CNQX GABAZINE	CADMIUM
n	29	6	16	9	10
Mean	17.6	11.2	25.8	26.6	38.3
S.E.M	2.5	3.0	3.4	9.1	7.6
Median	14.0	10.0	23.0	20.0	36.6
NA	1	0	0	0	0
Statistics	Kruskal-wallis p=0.0098				
Dunn's multiple comparison test		NS	NS	NS	<0.05 (*)

Proportion of aborted CSD (%)

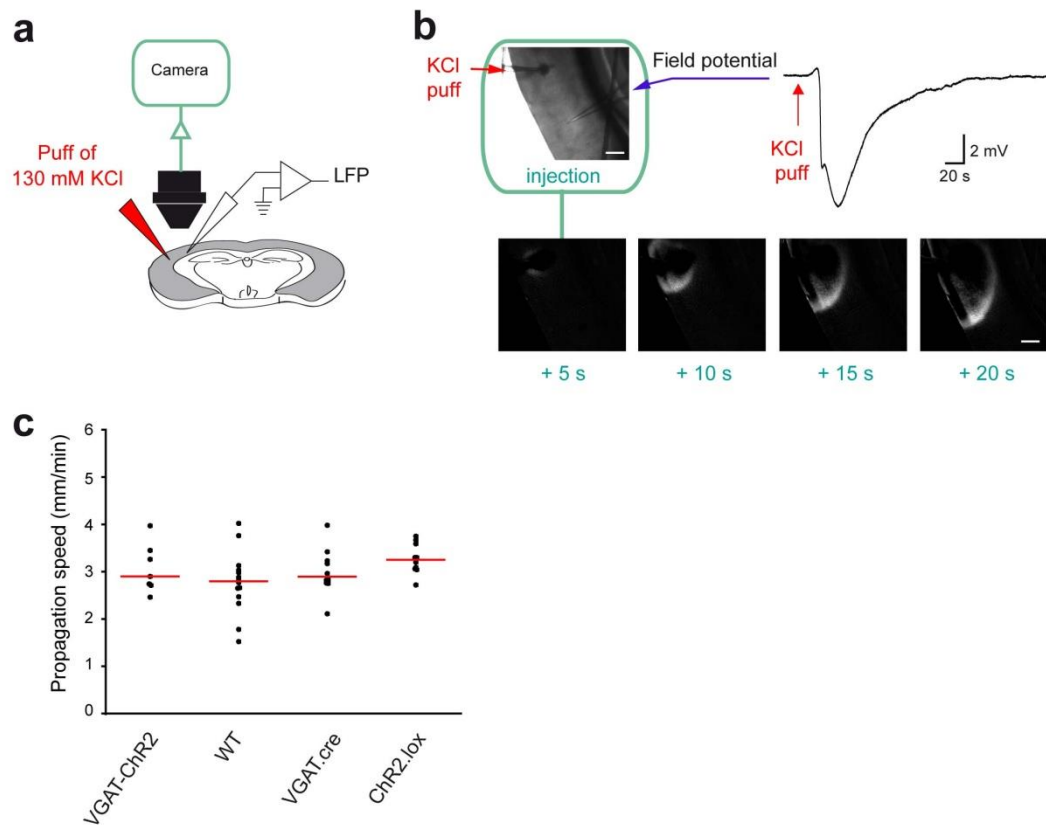
	Ctrl	GABAZINE	CPP CNQX	CPP CNQX GABAZINE	CADMIUM
n	0/30 (0%)	0/6 (0%)	4/16 (25%)	0/9 (0%)	7/10 (70%)
Statistics	Fisher's exact test p=3.6e-06				
Pairwise test adjusted with Bonferroni correction		NS	=0.0111 (*)	NS	<0.0001 (***)

NA = Data Not Available

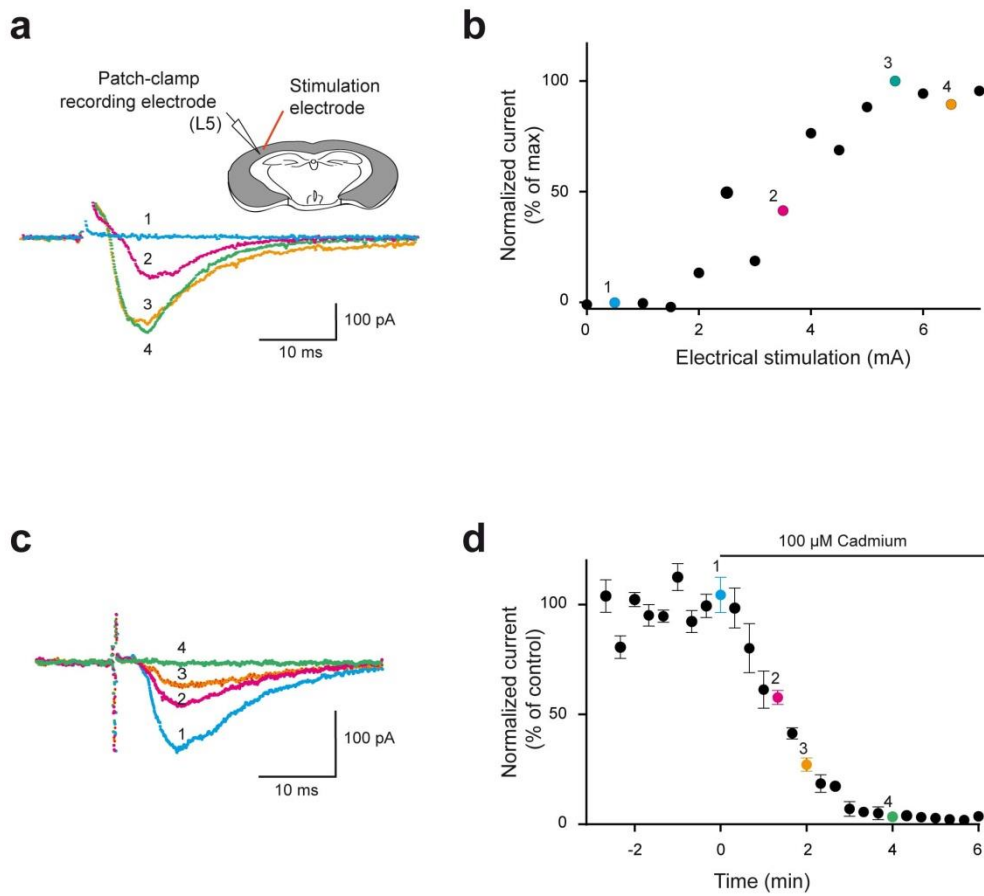
Table. Effect of block of synaptic transmission or neuronal excitability on CSD induced by optogenetic stimulation. Success rate (%), propagation speed (mm/min) and initiation latency (seconds) of CSD induced 470 nm illumination in slices from VGAT-ChR2 mice treated with a GABA-A receptor antagonist (Gabazine-15 μ M) and/or NMDA-AMPA-Kainate receptor antagonists (CPP-10 μ M, CNQX-20 μ M), with the calcium channel/synaptic release blocker cadmium (Cd²⁺-100 μ M), or with the sodium channel/action potential blocker tetrodotoxin (TTX-1 μ M). The number of CSD, induced by 470 nm illumination, that quickly stop after initiation (reported as aborted CSD) is also quantified. Note that some of these results have been already presented in Fig.3c. "n" refers to the number of slices, and "NA" to data not available (see methods).



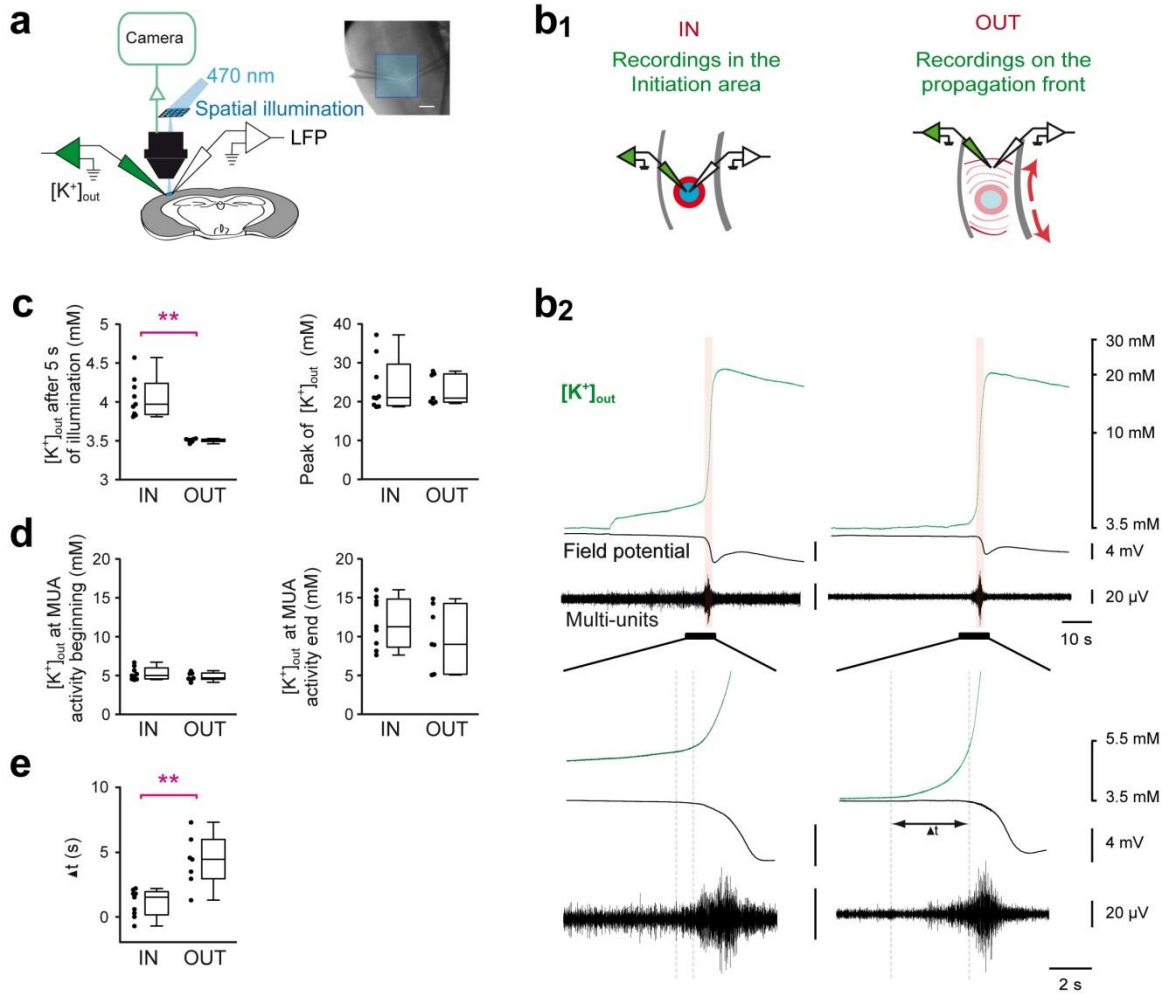
Supplementary Figure 1. (a) Mouse lines crossed for generating VGAT-ChR2 mice used for optogenetic experiments. (b) Representative images of neocortical immunostainings with a neuronal marker (NeuN), an astrocytic marker (S100 β) and a marker of excitatory neurons (CamKIIa) in tissue from the mouse reporter line VGAT-tdTomato, in which VGAT-Cre+ cells (i.e. GABAergic neurons) express the cytoplasmatic tdTomato fluorescent protein. Scale bar: 10 μ m (c) Quantifications of NeuN+ cells ($95 \pm 1\%$, grand average of 3 mice + SEM), S100 β + cells ($3.0 \pm 0.9\%$, grand average of 3 mice + SEM), and CamKII+ cells ($2.0 \pm 0.5\%$, grand average of 3 mice + SEM) among VGAT-tdTomato cells, confirming that ChR2 in VGAT-ChR2 mice is not expressed in excitatory neurons and astrocytes. We have not used VGAT-ChR2 mice in these experiments because the fluorescence of tdTomato-tagged ChR2 is mainly limited to the plasma membrane, and thus difficult to identify for an accurate quantification.



Supplementary Figure 2. (a) Experimental design of KCl-triggered CSD. CSD was triggered by a focal puff of 130 mM KCl applied using a picopump (10 PSI, 500 ms). Fastgreen (0.1%) was added to the KCl solution to visualize the effective KCl injection and quantify its area (mean = 0.030 ± 0.005 mm², n = 10 slices). (b) Representative CSD revealed by both a negative DC shift in the LFP and changes in light transmittance (intrinsic optical signal, IOS). The 4 lower panels show representative IOS images of CSD at different time points (image processing of raw images to better highlight CSD propagation, see methods). Scale bars: 250 μ m. (c) Dot plots of the propagation speed (Kruskal-Wallis test p = 0.32) in slices from VGAT-ChR2 mice (n = 7 slices), WT (n = 14), VGAT:cre (n = 10) and ChR2:lox (n = 10); for the last three conditions the slices are those presented in Fig1d, in which CSD has been induced with 130 mM KCl after the unsuccessful optogenetic illumination. Bars correspond to medians. Pooling all the data, the CSD ignited by the KCl puff propagated within the cortical tissue at 3.01 ± 0.08 mm/min (n = 41 slices, mean \pm SEM).



Supplementary Figure 3. Complete block of cortical synaptic transmission with bath application of Cd²⁺. (a) Representative post-synaptic currents (EPSCs) recorded from a Layer 5 pyramidal neuron (holding potential -60 mV), evoked by Layer 2/3 single stimulations (0.05 Hz) with incremental intensities. Schematic representation of the experimental design is depicted in the top right inset. Stimulation artefacts have been truncated. (b) Representative input-output curve from this cell, allowing the determination of the intensity evoking the maximal EPSC amplitude. (c) Representative EPSCs before and during bath application of the Ca²⁺ channel blocker Cd²⁺ (100 μ M), with stimulation that evoked the maximal EPSC responses. (d) Time course of the blocking effect of Cd²⁺ on normalized maximal EPSC amplitudes, consistent with complete block of synaptic transmission. Each point represents mean of normalized currents \pm SEM ($n = 5$ cells). Same colors were used in representative traces and pooled data. One-sided paired Wilcoxon Signed Rank Test (before and after 4min of Cd²⁺ perfusion, $p = 0.031$).



Supplementary Figure 4. (a-b1) Experimental design to compare dynamics of $[K^+]_{out}$ within and outside the initiation area of the CSD ignited using spatial illumination. Scale bar: 250 μm . (b2) Representative traces of $[K^+]_{out}$ dynamics before and during CSD initiation in both areas, with associated field potentials recordings and multi-unit activities (MUA). The vertical orange area highlights the period of paroxysmal MUA, which corresponds to the transient intense neuronal firing that precedes the long lasting depolarization in CSD. The bottom panel highlights, with an enlarged time scale, the time lags (Δt , dotted lines) between the increase in $[K^+]_{out}$ (at the foot of the abrupt increase observed during the CSD) and the beginning of the negative DC deflection of the field potential. (c-e) Dot and box-chart plots (Whiskers represent minimum and maximum) of $[K^+]_{out}$ inside (IN; $n = 9$) and outside (OUT; $n = 7$) the CSD initiation zone, (c) after 5 seconds of illumination (Mann-Whitney test $*** p = 0.001$) and at maximal peak amplitude (Mann-Whitney test $p = 0.76$), (d) at the beginning (Mann-Whitney test $p = 0.53$) and at the end (Mann-Whitney test $p = 0.31$) of paroxysmal MUA. (e) Time lags between $[K^+]_{out}$ and the negative DC shift of local field potentials at CSD initiation (Mann-Whitney test $** p = 0.0059$). Note the slow increase of $[K^+]_{out}$ in the initiation area during optogenetic illumination until CSD triggering, in contrast to the sharp $[K^+]_{out}$ increase recorded during CSD propagating outside the initiation area. CSD recorded "inside" and "outside" the illumination area were triggered at the same $[K^+]_{out}$ concentration (~ 12 mM; end of MUA activities) (d). Note that recordings in the initiation area have been already presented in Fig.4.

a

Success rate (%)

See Fig3a & Fig3b

Propagation speed of CSD (mm/min)

	Ctrl	Na _v 1.1 ^{+/-}	Na _v 1.1 ^{+/-} + ACSF 8mM KCl
n	27	12	7
Mean	2.41	3.20	3.97
S.E.M	0.15	0.20	0.28
Median	3.07	3.12	3.95
NA	0	0	0
Statistics	Kruskal-wallis p=0.07		

Latency of CSD induction (in seconds)

	Ctrl	Na _v 1.1 ^{+/-}	Na _v 1.1 ^{+/-} + ACSF 8mM KCl
n	23	11	6
Mean	39	45	51
S.E.M	4	5	14
Median	39	38	47
NA	4	1	1
Statistics	Kruskal-wallis p=0.70		

NA = Data Not Available

b

Success rate (%)

	Ctrl	VU0240551 10μM	VU0463271 10μM	Isoguvacine 10μM	VU0463271 10μM + IsoG 10μM
n	39/39 (100%)	12/12 (100%)	17/20 (85%)	11/11 (100%)	9/10 (90%)
Statistics	Fisher's exact test p=0.049				
Pairwise test adjusted with Bonferroni correction	NS	NS	NS	NS	NS

Propagation speed of CSD (mm/min)

	Ctrl	VU0240551 10μM	VU0463271 10μM	Isoguvacine 10μM	VU0463271 10μM + IsoG 10μM
n	38	12	15	11	9
Mean	3.38	3.12	3.32	3.08	3.19
S.E.M	0.13	0.26	0.18	0.25	0.16
Median	3.42	2.89	3.28	3.12	3.00
NA	1	0	2	0	0
Statistics	Kruskal-wallis p=0.54				

Latency of CSD induction (in seconds)

	Ctrl	VU0240551 10μM	VU0463271 10μM	Isoguvacine 10μM	VU0463271 10μM + IsoG 10μM
n	37	12	11	11	9
Mean	20.0	21.0	16.5	19.0	24.0
S.E.M	2.3	4.2	3.5	3.5	9.1
Median	14.0	14.0	13.0	15.0	12.0
NA	2	0	6	0	0
Statistics	Kruskal-wallis p=0.93				

Supplementary table. Effects of Na_v1.1 loss of function and KCC2 inhibitors on CSD induced by optogenetic stimulation. Success rate (%), propagation speed (mm/min) and initiation latency (seconds) of CSD induced 470 nm illumination (a) in slices from VGAT-ChR2 Na_v1.1^{+/-} mice and VGAT-ChR2 littermate, perfused with rACSF (control condition) and after [K⁺]_{out} increase to 8 mM in VGAT-ChR2-Na_v1.1^{+/-} slices ; (b) in slices from VGAT-ChR2 mice treated with blockers of the K⁺-Cl⁻ co-transporter KCC2 (VU024551-10 μM or VU0463271-10 μM) alone or with a GABA-A receptor agonist (Isoguvacine-10 μM), used to increase KCC2 baseline activity. Note that some of these results have been already presented in Fig.3a, b. "n" refers to the number of slices, and "NA" to data not available (see methods).

Les données de l'étude précédemment présentée montrent qu'une suractivation des canaux Nav1.1 ou des neurones GABAergiques est suffisante pour déclencher dans le néocortex sain une dépression corticale envahissante, par l'augmentation progressive de la concentration extracellulaire en potassium jusqu'à une valeur critique. Nous avons donc pu valider notre hypothèse de travail. De plus, de façon surprenante, nous montrons que ce déclenchement est indépendant de la transmission synaptique, mettant en évidence un nouveau mécanisme d'induction de la DCE. Afin de mieux comprendre les caractéristiques de ce nouveau mécanisme nous avons poursuivi notre étude par des expériences supplémentaires.

Réponses des neurones Fast-spiking et Pyramidaux à l'activation optogénétique des neurones GABAergiques

L'activation des neurones GABAergiques par l'optogénétique grâce à l'expression spécifique de la protéine ChR2, permet le déclenchement d'une DCE dans le néocortex et en parallèle une augmentation progressive de la concentration en potassium extracellulaire. Les enregistrements en LFP montrent une hyperexcitabilité de réseau qui s'installe dès la stimulation jusqu'à l'induction de la DCE, suivie d'une période de dépression.

L'enregistrement intracellulaire en patch-clamp permet de mettre en évidence la réponse des différents types de neurones à cette stimulation et de comprendre comment s'installe l'hyperexcitabilité de réseau menant à la DCE.

Pour ce faire nous avons réalisé des enregistrements patch-clamp en «current-clamp» et configuration cellule entière dans la zone d'illumination en illumination spatiale. Avant la stimulation, chaque neurone est préalablement identifié par le motif de réponse en PA à des steps de courant croissant, afin de différencier les neurones GABAergiques fast-spiking des neurones non fast-spiking. Les tentatives d'induction sont ensuite enregistrées, jusqu'au déclenchement de la DCE ou après 120 secondes d'illumination. La

réponse à la stimulation est calculée entre le début de l'illumination et la dépolarisation ou l'apparition du premier potentiel d'action.

Grace à l'expression de la ChR2 dans les neurones GABAergiques, la réponse à la stimulation optogénétique est d'en moyenne 140 ms (+/- 123), tandis que les neurones pyramidaux ne se dépolarisent qu'après 18409 ms (+/- 4462). La différence de délais entre les neurones fast-spiking et les neurones non fast-spiking est significative (*, $p < 0.05$, Mann Whitney test).

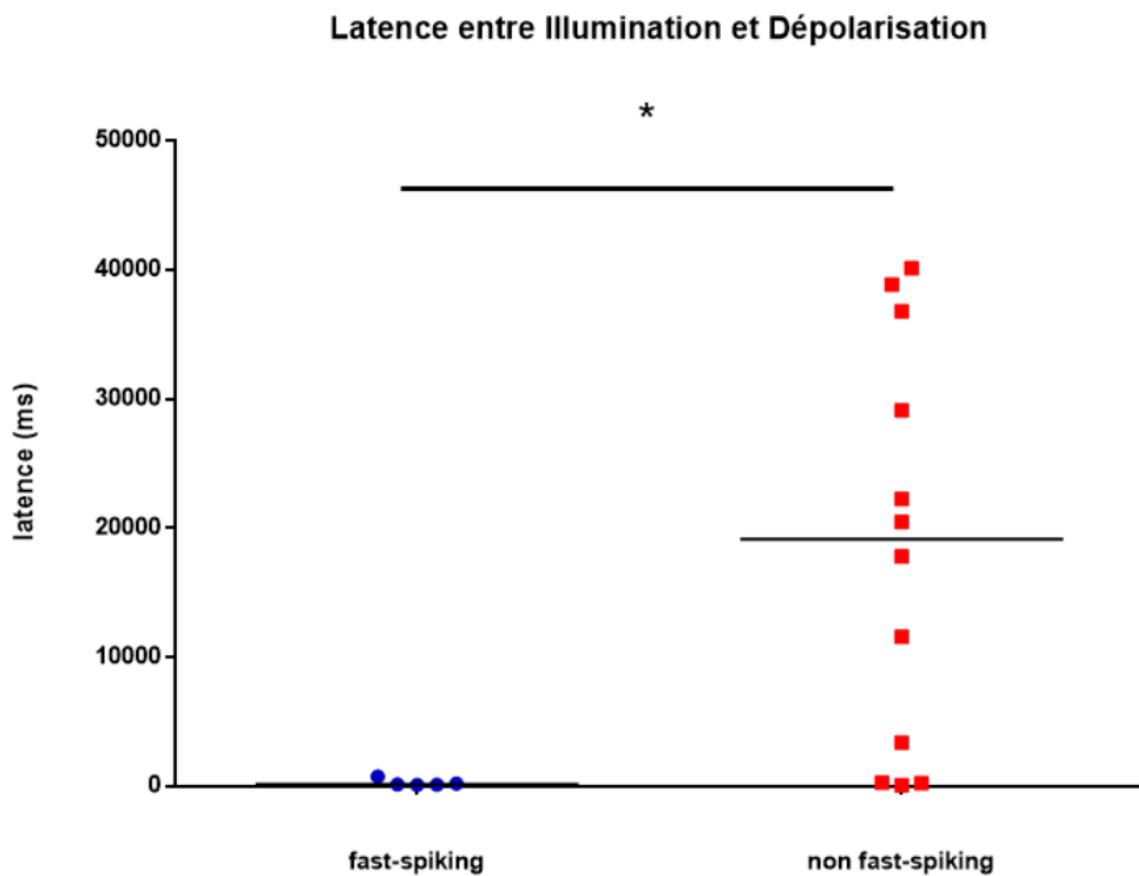


Figure 27 Comparaison de la latence de dépolarisation à l'illumination, enregistrée en patch-clamp curent clamp cellule entière, entre les neurones fast-spiking GABAergiques et les neurones non fast-spiking. La médiane est représentée.

Il existe une certaine variabilité dans le groupe « non fast-spiking », où des neurones répondent à la stimulation de la même manière que les neurones fast-spiking. Dans nos conditions, il n'est pas possible de différencier par fluorescence les neurones GABAergiques non fast-spiking des neurones pyramidaux. Il est probable que ces neurones se dépolarisent très vite et compris dans les neurones non fast-spiking soient en vérité des neurones GABAergiques.

Nos résultats montrent que les neurones GABAergiques se dépolarisent et déchargent dès la stimulation optogénétique, et que les autres types de neurones ne se dépolarisent que bien après, confirmant ainsi notre hypothèse selon laquelle la suractivation des neurones GABAergiques est la première étape du processus menant à la dépolarisation et l'hyperexcitabilité de réseau qui génère la DCE. Ces résultats doivent être complétés par des expériences d'enregistrements juxtacellulaires

Effets de l'activation des canaux Nav1.1 sur les propriétés électrophysiologiques des neurones « fast-spiking »

Pour déterminer l'effet de la toxine sur les propriétés des neurones GABAergiques « fast-spiking » des enregistrements patch-clamp en current-clamp et configuration cellule entière ; nous appliquons des steps croissants de courants et enregistrons les décharges des PA générés en réponse aux courants injectés, d'abord en condition contrôle, puis en présence de la toxine. Le nombre de PA en fonction du courant injecté est ensuite reporté en diagramme.

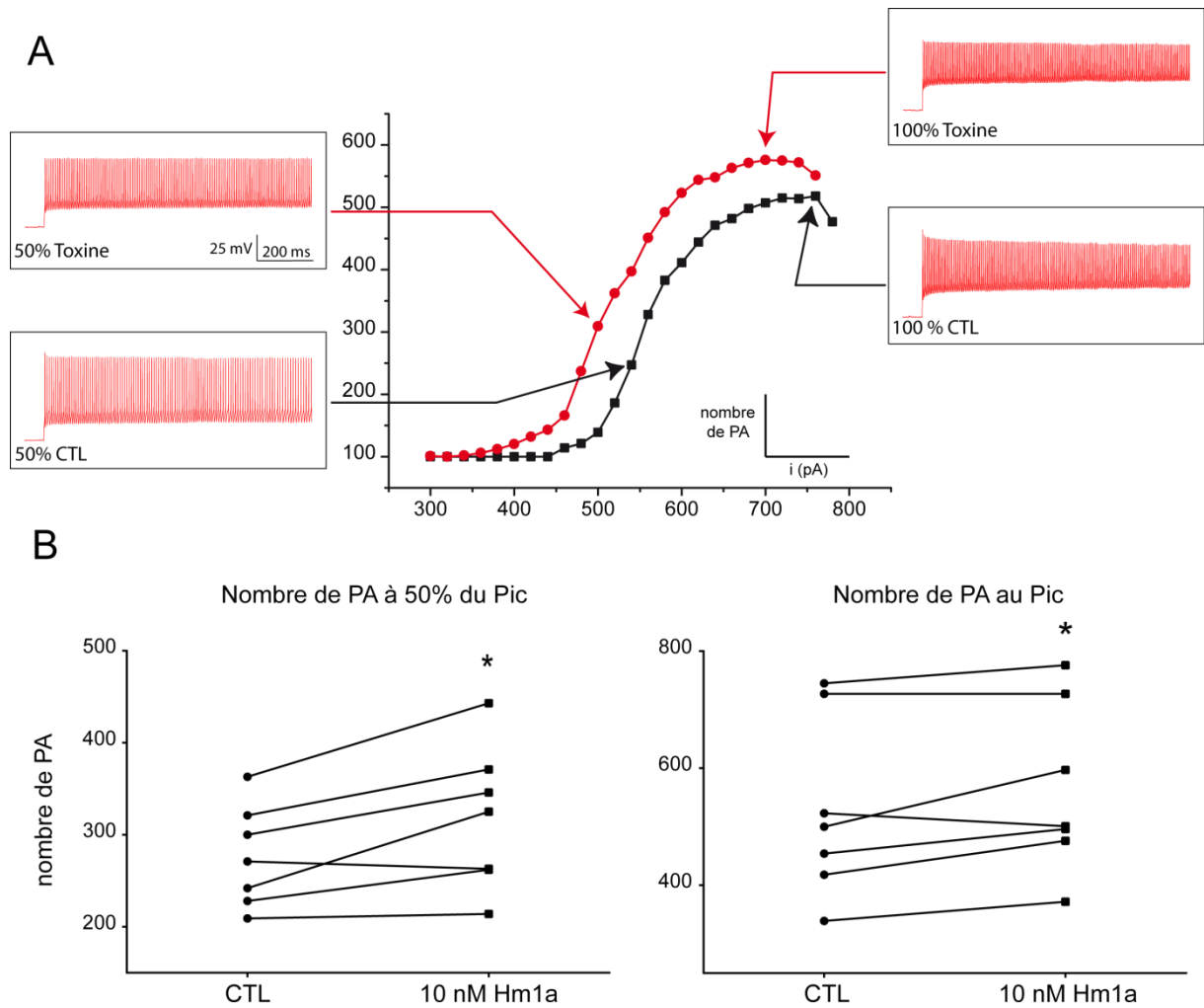


Figure 28 A) Courbes représentatives de la relation entre nombre de potentiels d'action et intensité du courant injecté en current clamp, en noir (●) les valeurs wild-type, et en rouge (●) les valeurs avec 10 nM Hm1a. Sont représentées les décharges de potentiels d'action à 100% ou pic (à droite) et à 50% de la réponse (à gauche) en condition contrôlée, puis pendant la perfusion de toxine. B) Quantification et comparaison des décharges de PA en contrôlée et sous toxine, à 50% de la réponse et au pic.

Au maximum de la réponse (pic) des neurones et à 50% du pic (50%), l'activation des canaux Nav1.1 par la toxine entraîne un plus grand nombre de potentiels d'action en réponse au courant injecté: à 50% du pic, * $p < 0.05$ one-tailed Wilcoxon matched-pairs ; à 100%, * $p < 0.05$ one-tailed Wilcoxon matched-pairs.

Nos résultats montrent que l'activation des Nav1.1 par la toxine et l'augmentation du courant persistant, se traduit par une augmentation des décharges de PA dans le temps, mais aussi en réponse à des valeurs de courants moins élevées qu'en condition contrôlée, démontrant une augmentation de l'excitabilité des neurones GABAergiques.

Effets de 10 nM Hm1a sur le néocortex, hippocampe et striatum

Dans leur étude, Richards et al (2018) (56) n'ont observé aucun effet de la toxine Hm1a dans les neurones inhibiteurs de l'hippocampe sur souris wild-type. La DCE induite lors de l'activation des canaux Nav1.1 par la perfusion de 10 nM Hm1a, montre que la toxine a bien un effet au niveau du néocortex. Pour déterminer si dans nos conditions expérimentales, Hm1a a un effet dans d'autres structures, nous avons élargi de champ de la caméra par une lentille 0.30x qui permet d'avoir dans le champ en plus du néocortex, l'hippocampe ou le striatum. Ces structures sont surveillées le temps de la perfusion de Hm1a, pendant 20 à 30 minutes.

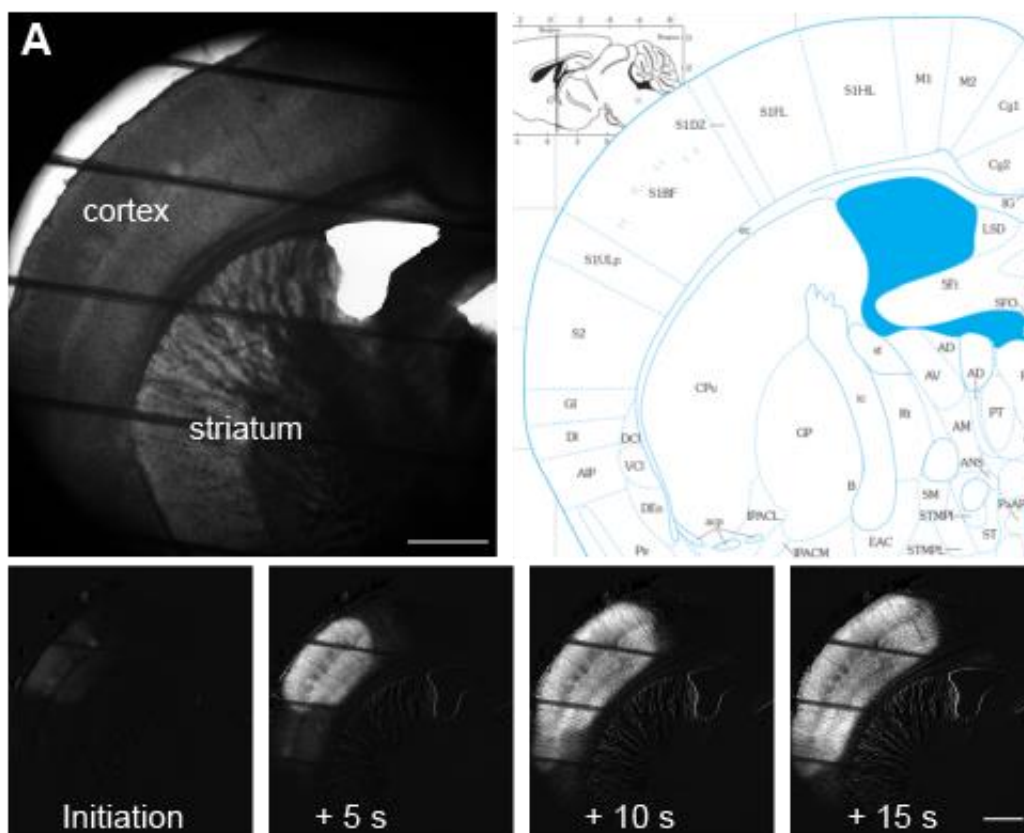


Figure 29 Exemple d'une induction de DCE dans le néocortex pendant la perfusion de la toxine Hm1a à 10 nM, sur une coupe de cerveau présentant le striatum. L'image du haut est issue de l'enregistrement brut ; la séquence d'images de la seconde ligne est le résultat de la soustraction d'images permettant d'isoler le signal de la DCE, qui n'est retrouvé que dans le néocortex.

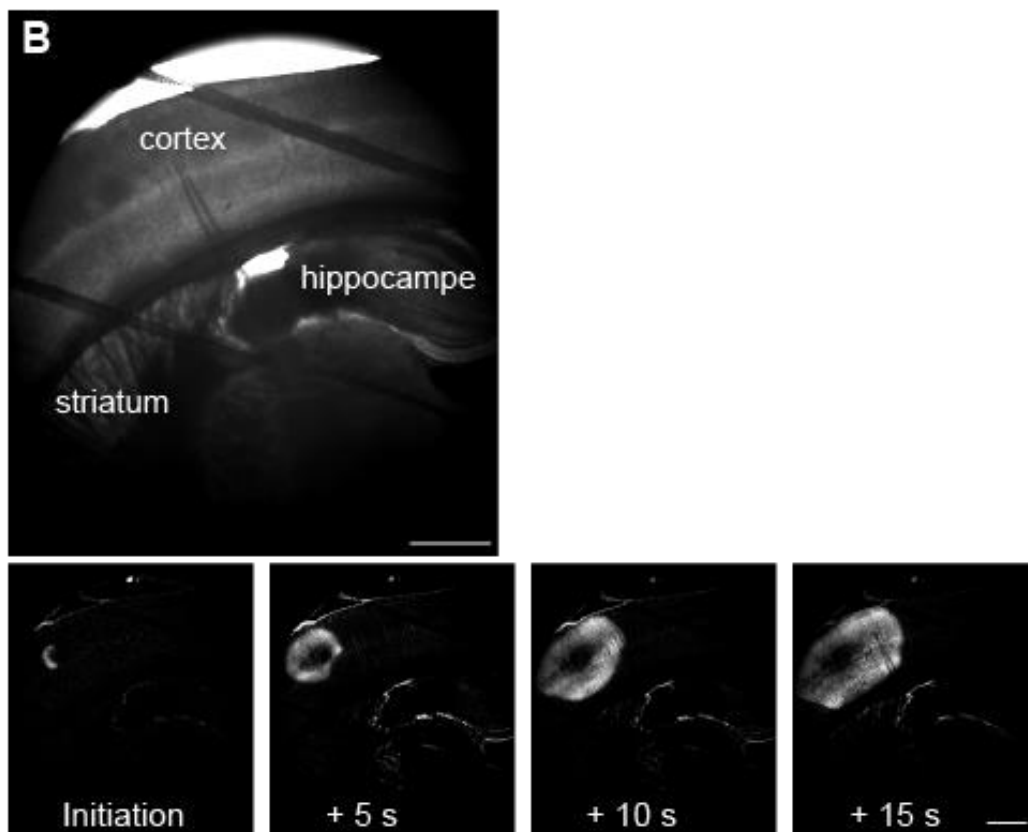


Figure 30 Exemple d'une induction de DCE dans le néocortex pendant la perfusion de la toxine Hm1a à 10 nM, sur une coupe de cerveau présentant l'hippocampe antérieur. L'image du haut est issue de l'enregistrement brut ; la séquence d'images de la seconde ligne est le résultat de la soustraction d'images permettant d'isoler le signal de la DCE, qui n'est retrouvé que dans le néocortex.

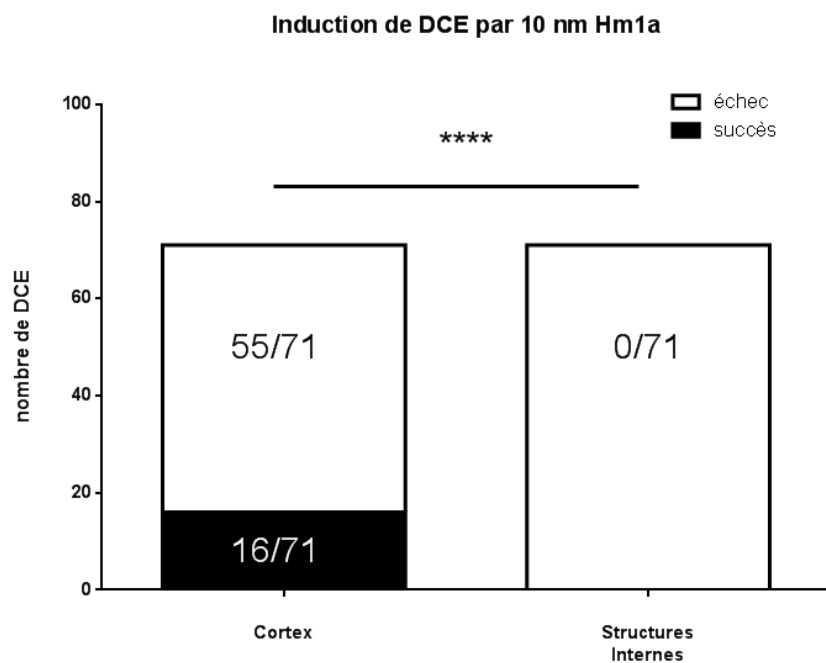


Figure 31 Comparaison du nombre d'induction de DCE par perfusion de 10 nM Hm1a entre le Néocortex et les Structures Internes (Hippocampe et Striatum) ; **** $p < 0.0001$ (test fisher exact, two-tailed).

La DCE est induite par perfusion de Hm1a 16 fois sur 71 tentatives, tandis que dans l'hippocampe ou le striatum, la toxine n'induit pas de DCE. Nos résultats montrent que la DCE par la perfusion de Hm1a est spécifiquement induite dans le néocortex, et qu'un tel phénomène n'est pas retrouvé dans les structures internes. L'induction préférentielle de la DCE dans le néocortex est appuyée par l'établissement d'une hyperexcitabilité des neurones GABAergiques du néocortex, et l'absence d'induction de SD dans les structures internes présentant une grande proportion de neurones GABAergiques, suggérant des mécanismes différents entre ces structures.

Suractivation des canaux Nav1.1 et DCE

D'après les données des résultats ci-dessus, la suractivation des canaux Nav1.1 sur tranches de néocortex, induit une hyperexcitabilité des neurones GABAergiques. Dans l'étude présentée dans le papier, nous avons montré que la suractivation des neurones GABAergiques augmente progressivement la concentration extracellulaire en potassium. Par ailleurs, nos expériences sur les tranches de cerveau de souris sensibles à l'optogénétique et invalidée pour le canal Nav1.1, montrent aussi qu'une augmentation de la concentration en potassium dans la solution extracellulaire de perfusion, restaure les taux d'induction de la DCE par optogénétique à des valeurs contrôle.

L'activation des Nav1.1 devrait donc augmenter progressivement la concentration en K⁺ extracellulaire jusqu'à induire une DCE « spontanée », comme nous l'avons aussi présenté. L'injection de volume croissant d'une solution concentrée de KCl (130 mM) dans le néocortex jusqu'à induire une DCE, est une technique permettant de quantifier la sensibilité à l'induction. Ainsi il serait possible de déterminer les modifications de la sensibilité à l'induction provoquées par l'activation des Nav1.1.

Pour ce faire, nous avons perfusé des tranches de néocortex de souris wild-type avec 10 nM Hm1a. Les tranches n'ayant pas induit une DCE par la perfusion de la toxine, sont induites par injection de KCl 130 mM. Pour déterminer l'effet sur l'induction de la DCE, une recherche de seuil est réalisée ; pour ce faire, des volumes croissants de la solution

de KCl 130 mM sont injectés jusqu'à l'induction de la DCE. Le volume nécessaire à l'induction est nommé « seuil d'induction ».

L'activation des Nav1.1 par la toxine ne semble pas influencer la sensibilité à la DCE induite par des injections progressives de KCl 130 mM (n(CTL)=9 ; n(Hm1a)=15 ; p=0,54, Mann Whitney test), ni la vitesse de propagation de la DCE (n(CTL)=9 ; n(Hm1a)=15 ; p=0,84, Mann Whitney test).

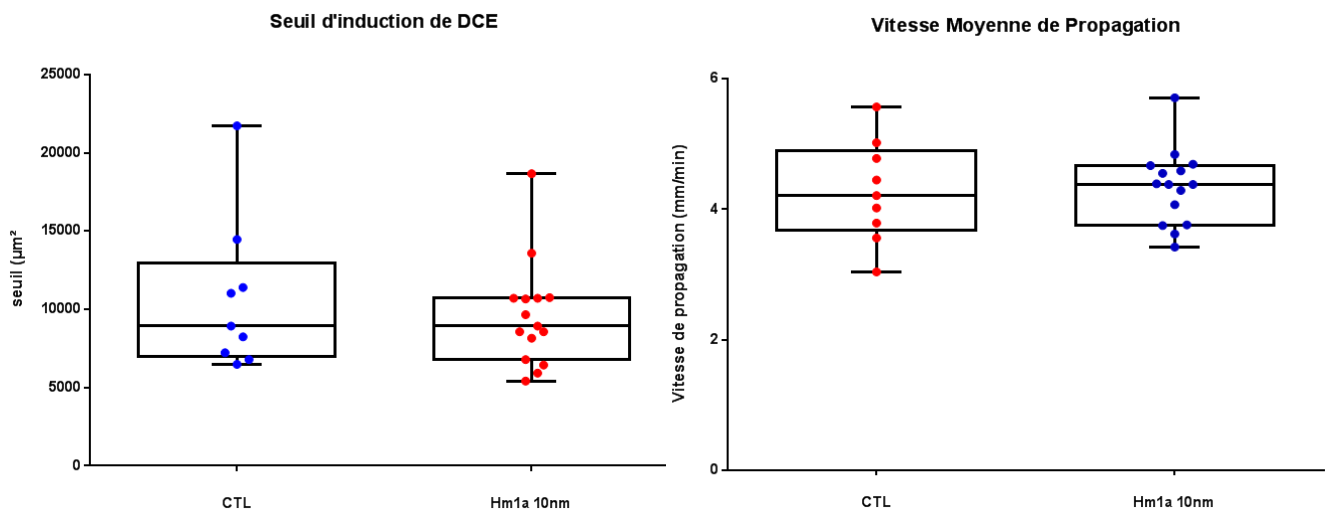


Figure 32 Comparaison des seuils d'induction, et des vitesses moyennes de propagation de la DCE. Les graphes sont représentés en « boîte à moustache » représentée par un rectangle allant du 1^{er} au 3^e quartile, coupé par la médiane, et d'un segment allant de la valeur minimale à la valeur maximale.

Nos résultats montrent que la recherche de seuil par injection de KCl 130 mM ne semble pas être influencée par l'activation des Nav1.1. La concentration utilisée pour cette expérience, bien que plus faible que celles retrouvées dans la littérature, et plus proche de la pathophysiologie, pourrait être trop forte pour révéler la sensibilité à la DCE. Une concentration plus proche de la physiologie et des concentrations critiques de K^+ extracellulaires enregistrées, présentées dans l'étude précédente et suffisantes pour une induction de DCE (12 mM), pourrait permettre d'améliorer la sensibilité de l'expérience.

Quantification de la durée de la DCE

Avec l'induction et la propagation, la durée est une caractéristique de la DCE. Nous avons comparé les durées de demi-amplitude, soit la durée qui sépare le temps à la demi-amplitude de la phase descendante du premier pic, au temps de demi-amplitude de la

phase ascendante du second pic, ou le cas échéant du premier pic. Ceci est mesuré dans les DCE générées par les trois modèles d'induction utilisés : par activation optogénétique des neurones GABAergiques (OPTO), par activation pharmacologique des canaux Nav1.1 (Hm1a) et par injection de solution KCl 130 mM (KCl).

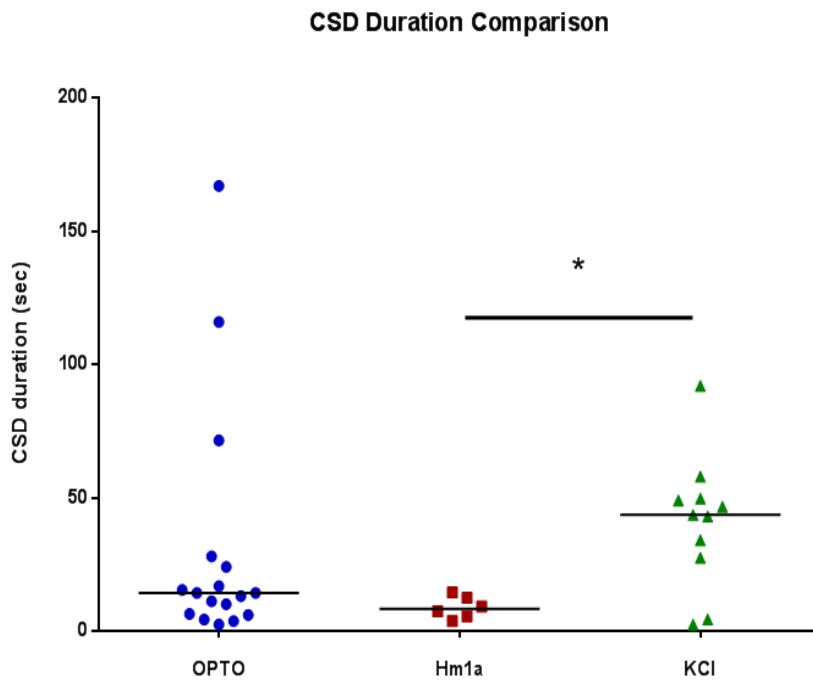


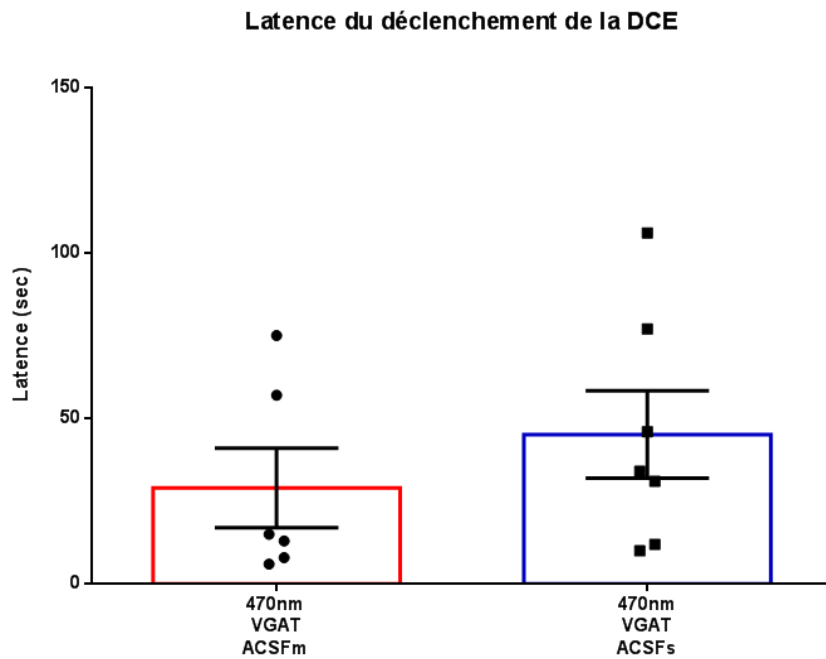
Figure 33 Répartition des durées de demi-amplitude de la DCE induite par trois modèles différents : par activation spécifique des neurones GABAergiques, activation sélective des canaux Nav1.1 et par injection de solution KCl 130 mM. Est représentée, la médiane.

Sont présentées les valeurs des durées prises à partir des DCE qui ont pu être enregistrées en totalité, et sont exclues les DCE dont le front de la vague n'a atteint l'électrode d'enregistrement. La durée moyenne de demi-amplitude est respectivement de 30.84 sec (± 11.03), 8.74 sec (± 1.67), et 40.94 sec (± 7.464). Un test Kruskal-Wallis révèle l'existence d'une différence significative (* $p < 0.05$), détaillée par une multiple comparaison post hoc

Nos résultats montrent une certaine variabilité dans les durées de DCE, qui peut être dépendantes des conditions d'enregistrement.

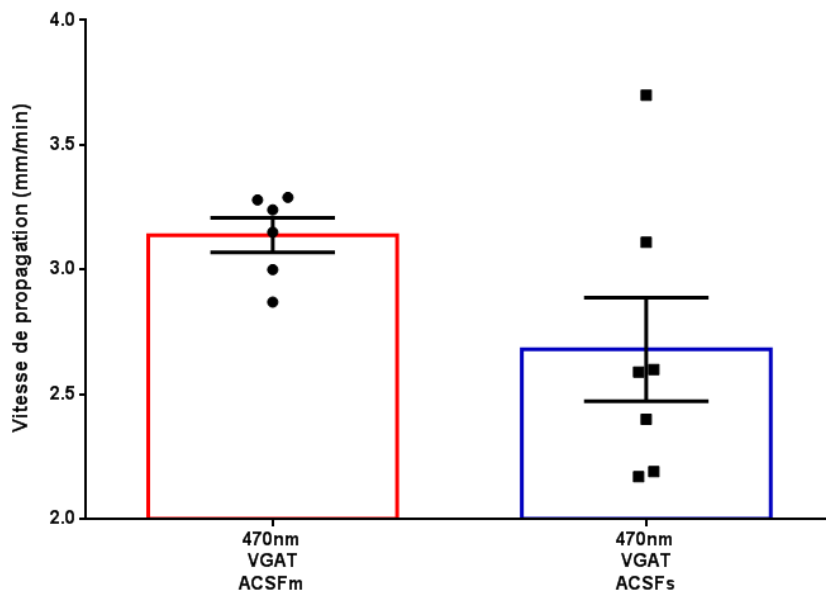
Effets sur l'induction de la DCE induite par activation des neurones GABAergiques d'une solution de perfusion à Ca^{2+} 2mM et Mg^{2+} 1mM

Nous avons comparé le taux d'induction de la DCE par activation spécifique des neurones GABAergiques lors d'une perfusion d'ACSF modifié (d'enregistrement) et d'ACSF standard (de coupe et de stockage). La composition de ces deux solutions extracellulaires, détaillée dans la partie *Matériels et Méthodes*, diffère dans la concentration en potassium, en calcium et en magnésium, l'ACSF de coupe étant plus concentrée en magnésium et en calcium.



La latence moyenne avant induction est 29 sec (± 12) en ACSFm (n=6) et de 45.14 sec (± 13.25) en ACSFs (n=7). Il n'y a pas de différence significative dans l'induction de la DEC entre les deux conditions de perfusion ($p=0.35$, test Mann Whitney).

Vitesse de propagation des DCE



La vitesse moyenne de propagation de la DCE est de 3.14 mm/min (± 0.06) en ACSFm ($n=6$) et de 2.68 mm/min (± 0.20) en ACSFs ($n=7$). Il n'y a pas de différence significative dans la propagation de la DCE entre les deux conditions de perfusion ($p=0.07$, test Mann Whitney). Nos résultats montrent que bien que la DCE tend à être plus facilement induite et plus rapide en ACSF modifié, elle est parfaitement inductible dans les deux conditions de solutions extracellulaires.

PARTIE 2 – MODULATION
MUSCARINIQUE DE LA
DEPRESSION CORTICALE
ENVAHISSANTE

**Cholinergic activation inhibits cortical spreading depression through muscarinic receptors
in acute mouse neocortical slices.**

Sarah Zerimech^{1,2}, Oana Chever^{1,2}, Fabrice Duprat^{1,2,3}, Massimo Mantegazza^{1,2,3}

1 Université Côte d'Azur, Valbonne-Sophia Antipolis, France.

2 CNRS UMR7275, Institute of Molecular and Cellular Pharmacology (IPMC), Valbonne-Sophia Antipolis, France.

3 Inserm, Valbonne-Sophia Antipolis, France.

Corresponding Author: Massimo Mantegazza: mantegazza@ipmc.cnrs.fr

Institute of Molecular and Cellular Pharmacology (IPMC), CNRS UMR 7275 and Université Côte d'Azur, 660 Route des Lucioles, 06560 Valbonne-Sophia Antipolis, France. Tel. +33 (0)493953425 FAX +33 (0)493957708

Running title: Muscarinic modulation inhibits CSD.

Keywords: migraine, aura, UP-DOWN states, neocortex, acetylcholine, carbachol, spreading depolarization.

Abstract

Cortical spreading depression (CSD) is a wave of transient network hyperexcitability leading to long lasting depolarization and block of firing, which initiates focally and slowly propagates in the cerebral cortex. It causes migraine aura and it has been implicated in the generation of migraine headache. Cortical activity can be potentiated by cholinergic modulation, leading in neocortical slices to the generation of rhythmic synchronous activities (UP-and-DOWN states), but there are no studies on the effect of cholinergic modulation on central migraine mechanisms.

We investigated the role of cholinergic activation with the cholinomimetic agonist carbachol on CSD triggered with 130mM KCl pulse injections in acute mouse neocortical brain slices, hypothesizing that the cholinergic-induced increase of cortical network excitability could facilitate CSD. Interestingly, we observed instead an inhibitory effect of cholinergic activation on both initiation and propagation of CSD, through the action of muscarinic receptors, as shown by the block of CSD inhibition with atropine and by the effect of the M1 muscarinic agonist McN-A-343, which was similar to that of carbachol.

This inhibitory action may be targeted for novel pharmacological approaches in the clinical treatment of migraine with specific muscarinic agonists, in particular of the M1 receptor.

Introduction

Cortical spreading depression (CSD) is a wave of transient intense network hyperexcitability leading to a long lasting depolarization and block of neuronal firing, which initiates focally and slowly propagates in the cerebral cortex (Ayata and Lauritzen, 2015; Dreier and Reiffurth, 2015). Mechanisms of CSD initiation and propagation are not completely understood yet, although increased extracellular K^+ concentration and increased release of the excitatory neurotransmitter glutamate are important factors (Pietrobon and Moskowitz, 2014). During CSD, transmembrane ion gradients collapse and cortical cells swell (Ayata and Lauritzen, 2015; Dreier and Reiffurth, 2015; Pietrobon and Moskowitz, 2014), altering the optical properties of the tissue, which induce modifications of the intrinsic optical signal (IOS) (Holthoff and Witte, 1996). CSD, which is generated in uninjured and normoxic tissue, has been causally related to migraine aura and proposed to be the trigger of neurogenic inflammation, leading to sensitization of meningeal nociceptors and migraine headache (Karatas et al., 2013; Lauritzen, 1994; Pietrobon and Moskowitz, 2013). Initiation and propagation of CSD are characterized by different features and mechanisms (Pietrobon and Moskowitz, 2014). Thus, migraine is a complex disorder, in which altered excitation-inhibition balance and hyperexcitability of cortical networks can be important pathological mechanisms (Vinogradova, 2018). Notably, they can have similarities with those that trigger epileptic seizures, although the exact differential mechanisms and the relationships between CSD and epileptic activity are not completely understood (Mantegazza and Cestele, 2018).

Cortical excitability is influenced by numerous neuromodulators. In particular, acetylcholine plays a major role in cortical arousal and desynchronization typical of awakening and REM sleep (Munoz and Rudy, 2014; Poorthuis et al., 2014), but also in the generation of slow rhythmic oscillations, UP-and-DOWN states, which are typical of slow-wave sleep and anesthesia, and are generated by cortical pyramidal neurons (Beltramo et al., 2013; Lorincz et al., 2015). Acetylcholine acts on both ionotropic nicotinic receptors and metabotropic muscarinic receptors. Its effect on the excitability of cortical neurons is complex, depending of the subtype of neuron and the subtype of receptor (Munoz and Rudy, 2014), but a prominent effect of cholinergic inputs is the disinhibition and depolarization of excitatory pyramidal neurons (Kurowski et al., 2015; Lorincz et al., 2015; Poorthuis et al., 2014; Wester and Contreras, 2013).

Carbachol is a broad spectrum cholinomimetic agonist that activates both muscarinic and nicotinic receptors; it is often used to induce cholinergic activation in cortical and hippocampal slices, which increase network activity and generates rhythmic activities in these “disconnected” preparations, for example UP-and-DOWN states in neocortical slices (Lorincz et al., 2015). Migraine-related studies have shown that blood infusion of carbachol can induce dilation of cephalic arteries and headache, but not migraine attacks (Schytz et al., 2010; Schytz et al., 2009). However, in our knowledge, there are no studies of central cholinergic effects on migraine pathological mechanisms.

We investigated here the role of cholinergic activation on CSD triggered with KCl injections in acute mouse neocortical brain slices, hypothesizing that the cholinergic-induced increase of cortical networks’ excitability could facilitate CSD. Interestingly, we observed an inhibitory effect of cholinergic activation by carbachol through the action of muscarinic receptors, probably of the M1 subtype, which may be a target in migraine therapy.

Methods.

Animal care and mouse lines.

Experiments were carried out with C57BL/6J mice (Charles River, France) according to the European directive 2010/63/UE and approved by institutional and ethical committees (approval #C06-152-5). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. Animals were group housed (5 mice per cage, or 1 male and 2 females per cage for breeding) on a 12h light/dark cycle, with water and food ad libitum.

Preparation of slices.

Brain slices were prepared from 30-40 day-old mice of both sexes as previously described (Hedrich et al., 2014; Liautard et al., 2013). Briefly, mice were killed by decapitation under isoflurane anesthesia, the brain was quickly removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF), which contained (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃ and 25 glucose, saturated with 95 % O₂ - 5 % CO₂. Acute coronal slices 400 μm thick were prepared with a vibratome (HM650V, MicroM, Germany) in ice-cold ACSF. Slices were then stored in a submerged chamber with ACSF at 32°C at least one hour before the beginning of the recordings.

Electrophysiological recordings and CSD quantification by intrinsic optical signal analysis

Single slices were placed in a submerged recording chamber (Warner Instr., USA) mounted on an Eclipse FN1 microscope (Nikon, Japan) and perfused with a modified ACSF solution (3ml/min), which was heated at 32°C and saturated with 95% O₂-5% CO₂. The mACSF contained (in mM): 125 NaCl, 3.5 KCl, 1 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃ and 25 glucose (Tottene et al., 2009).

Cortical spreading depression was induced by brief pulses of KCl 130mM applied in superficial neocortical layers (L II-III) with a glass micropipette (2-4 MΩ) connected to an air pressure injector (holding pressure: < 1 PSI, injection pressure: 7 to 10 PSI; PV820 Pneumatic Picopump, WPI, USA). Fastgreen (0.1 %, SIGMA-Aldrich, USA) was added to the pipette solutions to quantify the injection area, a more reliable measurement than the picopump injected volume. The area of injection was increased by repeating the injections until CSD

was ignited, which defined the CSD threshold. Applications of control NaCl solutions with Fastgreen never ignited CSD.

DC extracellular field potential recordings were performed using borosilicate glass micropipettes (0.5-1 M Ω) filled with mACSF and placed about 500 μ m away from the CSD induction area, a Multiclamp 700B amplifier, a Digidata 1440A acquisition board and pClamp 10.3 software (Molecular Devices, USA). Signals were filtered at 10 kHz and sampled at 25 kHz. Analyses were performed using pClamp 10.3.

Intrinsic optical signal (IOS: near-infrared light transmittance) (Holthoff and Witte, 1996) was monitored acquiring images with a CoolSnap ES2 CCD camera controlled with micromanager (Edelstein et al., 2014) at 1 image/s. Image analysis was used to identify the CSD wave front using ImageJ-Fiji (Schindelin et al., 2015) Image processing with a custom made ImageJ-Fiji macro (csd_analysis, available at <https://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/scripts/imagej.htm>) was used to quantify CSD threshold and propagation speed: to eliminate the background and isolate the wave from the raw image, a representative image acquired before the KCl injection was subtracted from the others and then white and black contrast was enhanced (0.35 AU). To determine the velocity of the propagating wave, successive line plots of the wave front from processed images (every 2 seconds) were drawn, and the spatial distances between them were quantified by means of the peak finder ImageJ plugin. For each slice, speed was estimated on a minimum of 4 time points (8 s).

Pharmacology

For each day of experiment, control CSD were first induced to check the quality of slices before to perform pharmacological studies. Then, before to quantify CSD properties in the corresponding condition of perfusion, slices were pre-incubated for 30 minutes in mACSF and 100 μ M Carbachol, or 100 μ M Carbachol + 10 μ M Atropine, or 10 μ M Atropine, or 30 μ M McN-A-343. Carbachol (Carbamoylcholine chloride) and Atropine (Atropine sulfate salt monohydrate) were bought from Sigma-Aldrich (USA), McN-A-343 from Tocris Bioscience (UK). Salts were bought from Sigma-Aldrich (USA).

Statistical analysis

All experiments were performed on at least 3 animals. Statistical tests were performed with Prism 5 (GraphPad, USA) or Origin 8 (Origin Lab. Corp, USA). We used the two-tailed non

parametric Mann-Whitney U test for comparing two groups, the Kruskal-Wallis test with the Dunn's post-hoc test for comparing more than two groups, and the Fischer's exact test for comparing proportions. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

CSD can be induced both *in vitro* and *in vivo* by applications in brain tissue of KCl at high concentration (Pietrobon and Moskowitz, 2014). Often, very high concentrations of KCl have been used, up to 2M, which are far above pathophysiological limits. We triggered CSD by injecting brief pulses (puffs) of 130mM KCl into the superficial layers of somatosensory cortex mouse brain slices (Fig 1A), concentration that is within pathophysiological limits and can better disclose real pathophysiological properties of CSD, in particular those related to initiation (Tang et al., 2014). CSD was monitored by electrophysiological local field potential (LFP) recordings and intrinsic optical signal (IOS) imaging. LFP recordings showed the typical profile observed during CSD, with a DC shift characterized by a faster negative peak phase and a slower later phase with return at the baseline (Fig.1B, upper right panel). Recordings of CSD by IOS imaging allowed to quantify propagation properties in the neocortex (Fig.1B, lower panels), which revealed the heterogeneous propagation of the CSD wave front in superficial vs deep layers (Fig.1C1). In fact, propagation in deeper layers (L 4-6) was 68% slower than in the superficial layers (L 1-3) (Fig.1C2).

To study the effect of the activation of cholinergic receptors on CSD properties, we pre-incubated brain slices with mACSF and 100 μ M carbachol in a holding chamber for 30 minutes at 32°C. Then the slices were transferred into the recording chamber and perfused with mACSF and 100 μ M carbachol at 32°C.

We initially evaluated the effect of carbachol on the excitability of the cortical network, performing LFP recordings simultaneously in the layers 3 and 5 of the somatosensory cortex from the same hemisphere. The application of carbachol induced rhythmic oscillatory activities (UP and DOWN states) that were particularly evident in the layer 5 and much less in superficial layers (Fig 2A), as it has been previously described (Lorincz et al., 2015). Thus, also in our preparation the pharmacological activation of cholinergic receptors enhances cortical excitability, generating periods of high activity (UP states).

CSD was ignited by puff injections of 130mM KCl in layer 2-3 both in control and in the presence of carbachol. Fig.2B shows that the LFP correlate of CSD was similar in the two conditions, characterized by a biphasic DC shift. However, with carbachol the threshold of CSD ignition (minimal area of KCl injection) was increased by 1.92 fold compared to control values, consistent with an inhibition of CSD initiation (Fig.2C1). Carbachol also induced a decrease of CSD propagation speed in both superficial (31% decrease) and deep (56%

decrease) layers compared to the control condition (Fig.2C2). Moreover, in the presence of carbachol, we observed that CSD could be self-limited, because it stopped before to propagate in the whole cortical tissue. Fig. 3A1 and Supplementary Video 2 show one of these abortive CSD, which was induced by the puff of KCl, but its propagation stopped before to reach the recordings pipette. In fact, the LFP trace did not show a DC shift (Fig.3A, upper right panel). Notably, CSD was limited to the area around the pipette used to inject KCl and did not reach Layer 1 or the pial surface. Abortive CSD were observed in 14% of the slices treated with carbachol and never in control conditions (Fig. 3B).

Thus, these results are consistent with the inhibition of both induction and propagation of CSD by cholinergic activation, although cholinergic activation can increase cortical excitability.

Next, we investigated the specific receptor involved in this effect. Carbachol is a cholinomimetic agent that can activate both muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors. To find out which pathway is involved in CSD inhibition, we used atropine, an antagonist of muscarinic receptors (Fig.4). All slices were pre-incubated with mACSF and Carbachol 100 μ M, Carbachol 100 μ M and Atropine 10 μ M, or only Atropine 10 μ M; then they were transferred into the recording chamber and perfused with the corresponding drugs. Experiments in which atropine was applied together with carbachol showed that the muscarinic antagonist blocked the inhibitory effect of carbachol on both induction and propagation of CSD. In fact, injection area and propagation speed in both superficial and deep layers reverted to control values. Atropine did not modify CSD properties compared to the control condition. Thus, the inhibition of CSD by carbachol is induced by the activation of muscarinic receptors.

We then investigated if activation of muscarinic receptors could have effects that are similar to those observed with carbachol. McN-A-343 is a muscarinic agonist with higher affinity for the M1 muscarinic receptor subtype (Mitchelson, 2012), which we used at the concentration of 30 μ M. Before to ignite CSD, we performed LFP recordings simultaneously in layers 3 and 5 of the neocortex from the same hemisphere. Differently than carbachol, McN-A-343 did not induce rhythmic UP-and-DOWN states, and we did not observe any obvious modifications of activity in comparison with the control condition (not shown). Puff injections of 130mM KCl induced CSD both in control and with McN-A-343 (Fig. 5). With McN-A-343, the threshold of induction showed a 2.7-fold increase (Fig.5B1) and the speed of propagation was reduced by

36% in superficial layers (Fig.5 B2). In deep layers the speed of propagation showed a non-statistically significant trend towards reduction.

Similar to Carbachol, 18% of the CSDs induced in the presence of McN-A-343 were abortive (2/11 with McN-A-343, 0/44 in control; $p=0.037$, Fisher's exact test), showing a self-limited propagation around the pipette used for injecting KCl.

Altogether, these results demonstrate that cholinergic activity, through muscarinic receptors, inhibits both initiation and propagation of CSD in the mouse neocortex.

Discussion

Cholinergic agents, with carbachol being the most frequently used, induce rhythmic activities in hippocampal and cortical brain slices that are generated by increased synchronous activity of neuronal networks and are similar to slow oscillations observed *in vivo*. In the neocortex, UP-and-DOWN states are generated by the activity of pyramidal neurons in infragranular layers (Beltramo et al., 2013). The activation of intrinsically bursting pyramidal neurons that rhythmically fire at low frequency in layer 5 is particularly important for the generation of the UP state, in which cortical neurons are depolarized and generate action potentials (Lorincz et al., 2015). Cholinergic activation can depolarize pyramidal neurons, engage them and sustain the generation of rhythmical UP states (Lorincz et al., 2015; Steriade et al., 1993; Wester and Contreras, 2013). We confirmed in our preparation that carbachol induced rhythmic UP states, which in LFP recordings are larger and more easily identifiable in layer 5 than in other layers.

However, this pro-excitatory action of carbachol did not facilitate CSD, although CSD is generated by a hyperexcitability of the cortical network leading to extended depolarizations. On the contrary, we show for the first time in our knowledge that CSD was inhibited by the cholinergic activation. This inhibitory action is carried out by muscarinic receptors, most likely of the M1 subtype. In fact, the muscarinic antagonist atropine blocked the inhibitory effect of carbachol on CSD, and McN-A-343, a preferential agonist of the M1 muscarinic receptor (Mitchelson, 2012), induced on CSD effects that were similar to those observed with carbachol. Notably, with McN-A-343 we did not observe the clear UP-and-DOWN states that were evident with carbachol. Therefore, CSD inhibition is not related to the cholinergic induction of these rhythmic activities, which should instead facilitate it, as already outlined. Evidently, the muscarinic action is characterized by different mechanisms and can counteract the facilitating effect possibly played by the cholinergic network activation.

Both initiation and propagation of CSD were inhibited in our experiments, although they are characterized by different mechanisms (Pietrobon and Moskowitz, 2014). In particular, in some experiments, CSD propagation was blocked and it did not reach the pial surface of the slice; *in vivo*, this could prevent the sensitization of meningeal nociceptors that are involved in headache generation. Thus, muscarinic modulation can induce both an increase of the threshold of CSD ignition and an inhibition of its propagation, which can lead to abortive CSD. These are synergic effects that could be used in migraine therapy for inhibiting CSD and

its consequences. Different drugs are used for migraine therapy in clinical practice, with different mechanisms that include reduction of excitatory signaling, enhancement of GABAergic inhibition, modulation of neuronal plasticity, inhibition of cortical spreading depression and/or reduction of circulating levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP, a peptide released by nociceptors and implicated in migraine headache) (Mantegazza et al., 2010; Sprenger et al., 2018). However, muscarinic agonists are not used in migraine treatment. Our results show that they could be a further possibility for the treatment of this debilitating and common disease. Therapies with muscarinic agonists are often limited by the side effects caused by the incomplete selectivity of these drugs for different muscarinic receptors subtypes, but novel compounds are under development that should be more selective and could have a larger clinical use (Bock et al., 2018).

Cholinergic responses in neocortical neurons and their synapses are complex (Munoz and Rudy, 2014). It is not straightforward to identify the muscarinic action involved in CSD inhibition. In fact, there are reports of increased neuronal excitability upon muscarinic activation. For instance, muscarinic receptor activation induced membrane potential depolarization through the M1 receptor-dependent activation of sodium channels in rat medial prefrontal cortex pyramidal neurons (Kurowski et al., 2015), and M1 activation elicited increased intrinsic neuronal excitability in the CA1 area of the hippocampus (Thorn et al., 2017). However, also inhibitory actions that could be consistent with CSD inhibition have been reported. For example, *in vivo* microinjections of the preferential M1 agonist McN-A-343 in the rat anterior cingulate cortex induced increased GABAergic synaptic transmission and anti-nociceptive effects to mechanical stimuli (Koga et al., 2017). Moreover, muscarinic actions have been implicated in long term depression (LTD) of synaptic functions. LTD facilitation induced by carbachol application has been reported in rat visual cortex slices, which was NMDA receptor-dependent and mediated by the activation of muscarinic receptors, probably M1 (Kirkwood et al., 1999). In the CA1 area of rat hippocampal slices, stimulation of cholinergic receptors with carbachol or the M1 agonist 77-LH-28-1 induced LTD (muscarinic LTD or mLTD), which was prevented by the muscarinic antagonist pirenzepine, NMDA receptor-dependent and linked to NMDA receptors internalization (Jo et al., 2010). Activation of M1 muscarinic receptors induce mLTD also in the prefrontal cortex, where it could depend on the co-activation of mGluR5 glutamate receptors, and also lead to increased GABAergic transmission on pyramidal neurons

(Ghoshal et al., 2017). LTD of glutamatergic synaptic transmission, which often leads to reduction of functional NMDA receptors, could be an important factor for CSD inhibition. In fact, CSD induced by focal KCl application is inhibited by the block of NMDA receptor, although NMDA receptor-dependency has been more convincingly demonstrated on propagation than on induction (Pietrobon and Moskowitz, 2014).

Overall, our results show that a muscarinic action in mouse neocortex lead to inhibition of initiation and propagation of CSD, overriding the pro-excitatory cholinergic action, which should facilitate CSD. This action might be targeted for novel pharmacological approaches in the clinical treatment of migraine with specific muscarinic agonists, in particular of the M1 receptor.

Acknowledgements.

This work has been funded by the Investissements d'Avenir-Laboratory of Excellence "Ion Channel Science and Therapeutics" (LabEx ICST ANR-11-LABX-0015-01). Our laboratory is a member of the "Fédération Hospitalo-Universitaire" InovPain (FHU-InovPain).

Legends to Figures

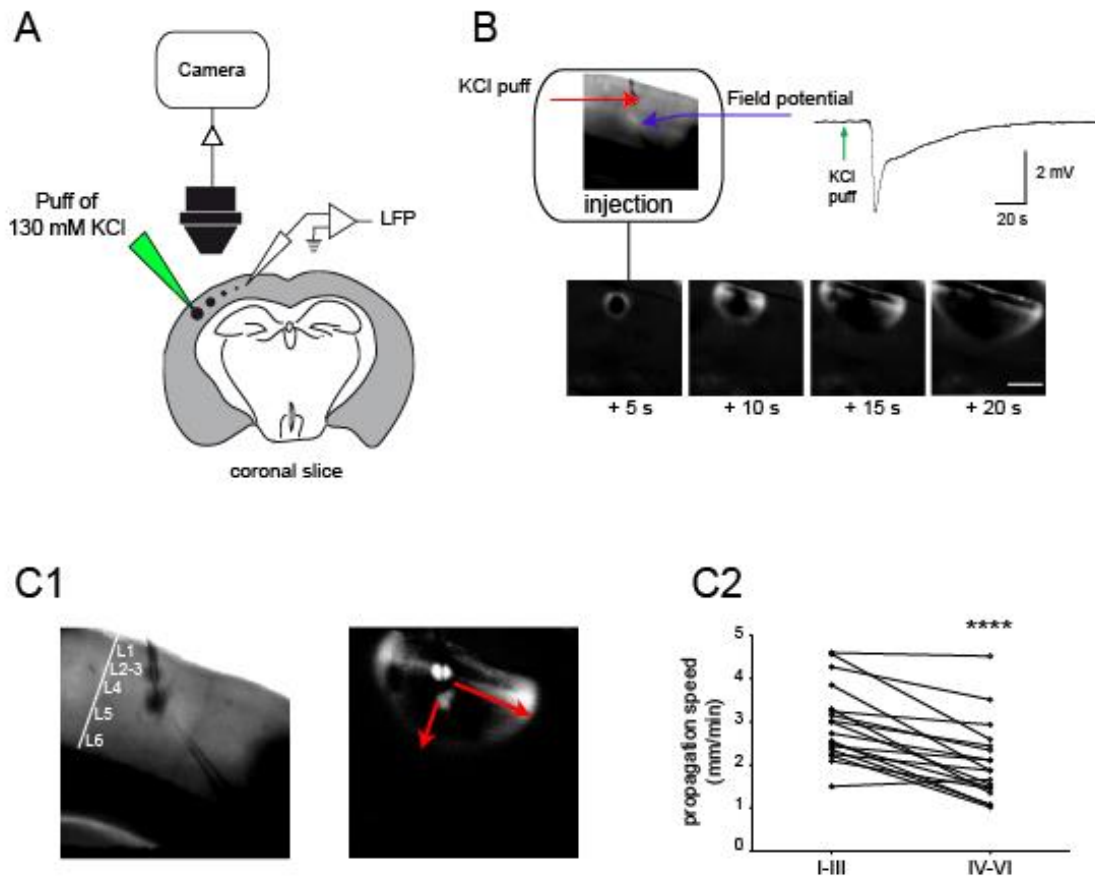


Figure 1. Cortical Spreading Depression (CSD) induction with 130mM KCl puffs and propagation in neocortical slices. A. Experimental design for KCl-triggered CSD, ignited by pulse injections (picopump puffs) with increasing volume of 130 mM KCl + 0.1% Fast green (for quantifying the injected area); CSD initiation and propagation were monitored by IOS imaging (light transmittance) and LFP recordings. B. Representative CSD revealed by a negative DC shift in the LFP recordings and changes in IOS at different time points (see methods), scale bar 500 μ m. C1. Representative images showing a somatosensory neocortical slice (Layers 1 to 6 are indicated) (left) and the corresponding IOS image showing the propagation wave front of CSD ignited in that slice by a puff of KCl; note the different CSD propagation speed across the layers. C2. quantification and comparison of the propagation speed in superficial (1-3) and deep (4-6) layers: (mean \pm SEM) 2.98 \pm 0.20 mm/min (n=18) in L1-3, 2.06 \pm 0.10 mm/min (n= 18) in L4-6; Wilcoxon matched-pairs test, $p < 0.0001$.

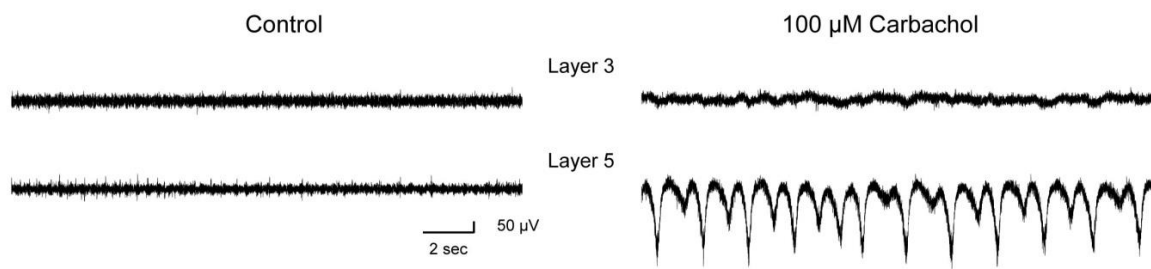
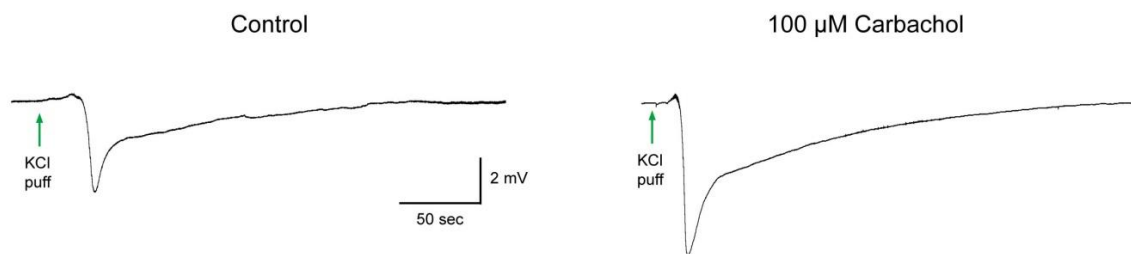
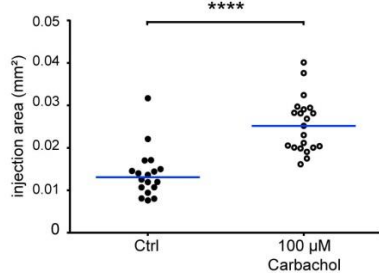
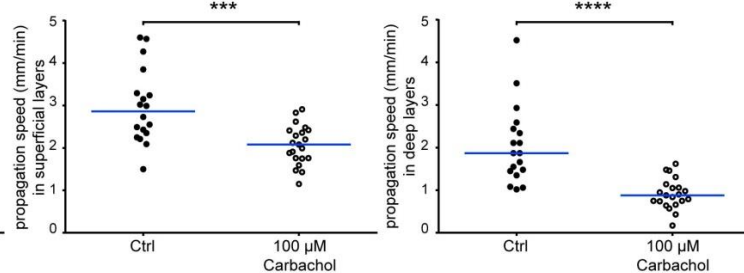
A**B****C1****C2**

Figure 2. CCH increases cortical excitability but inhibits CSD. A. Comparisons of LFP recordings in layers 2-3 and 5 of somatosensory cortex slices in control and in presence of Carbachol (100 μ M), which induced clear rhythmic oscillatory activities (UP and DOWN states) in layer 5; UP and DOWN states were less evident in layer 2-3. B. Representative LFP recordings of CSD ignited with a puff of KCl in control (left) and in the presence of Carbachol (right). C. Scatter plots of CSD threshold of ignition (KCl injection area) (1) and propagation speed in superficial and deep layers (2) in control and with carbachol; horizontal bars represent medians. Carbachol increased CSD threshold of ignition ($0.013\pm 0.057\text{mm}^2$ in control, $n=18$, $0.025\pm 0.065\text{mm}^2$ with carbachol, $n=21$; Mann Whitney test, $p < 0.0001$) and reduced CSD propagation speed in both superficial layers ($2.98\pm 0.20\text{mm/min}$ in control, $n=18$, $2.06\pm 0.10\text{mm/min}$ with carbachol, $n=21$; Mann Whitney test, $p < 0.001$) and deep layers ($2.05\pm 0.21\text{mm/min}$, $n=18$ in control, $0.91\pm 0.07\text{mm/min}$, $n=21$, with carbachol; Mann Whitney test, $p < 0.0001$). Values are reported as mean \pm SEM.

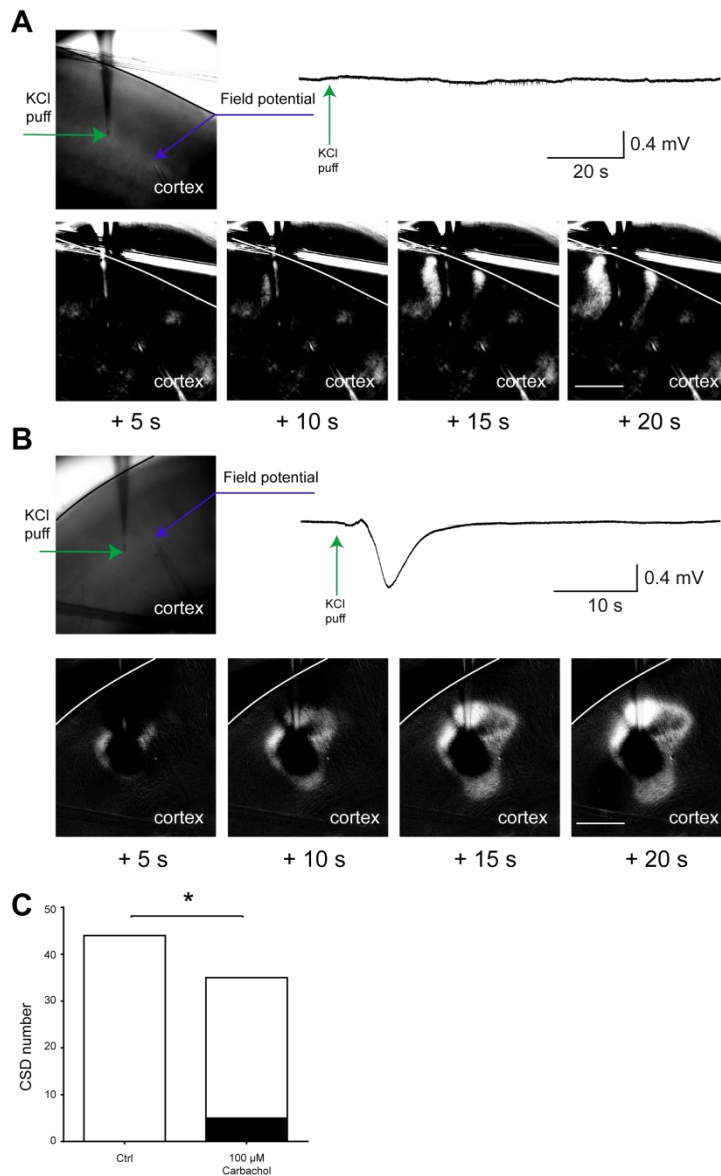


Figure 3. Carbachol can block CSD propagation. A. Representative experiment in which CSD was self-limited and propagated only in a relatively small area around the pipette used for injecting KCl; notably CSD reached the LFP pipette before to stop, but did not propagate to Layer 1 and the pial surface. B. Another representative experiment in which CSD did not reach the LFP pipette, as clearly shown by the field potential recording trace. C. Bar-graph showing that there were no abortive CSD in control (0/44, whereas with carbachol 14% of CSD were abortive (5/35). Fisher's exact test, $p=0.014$.

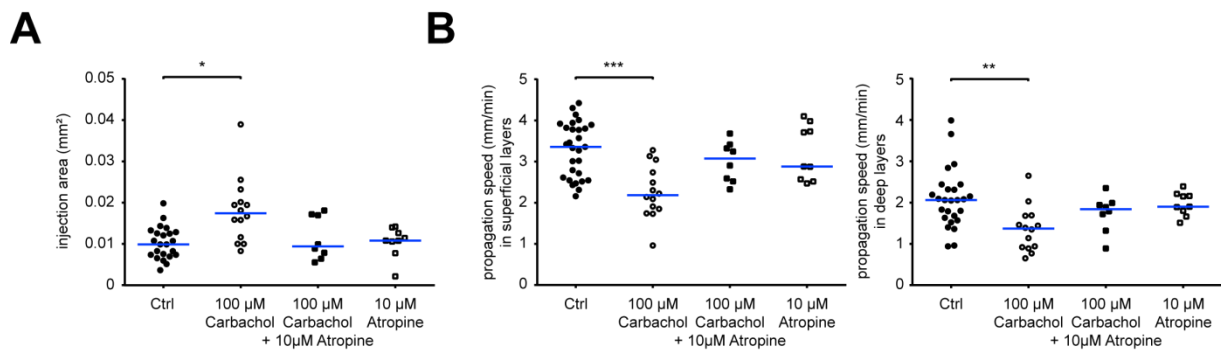


Figure 4 Involvement of muscarinic receptors on carbachol inhibition of CSD. A. Scatter plots of CSD threshold (area of KCl injection) in control (0.012 ± 0.001 mm²; n=26), with carbachol 100µM (0.019 ± 0.02 mm²; n=14; Kruskal-Wallis test with Dunn post-hoc test, p=0.023), carbachol 100µM & Atropine 10µM (0.011 ± 0.02 mm²; n=8), or Atropine 10µM (0.011 ± 0.001 mm²; n=9). B. Left, propagation speed in superficial layers in control (3.34 ± 0.13 mm/min; n=26), with carbachol 100µM (2.26 ± 0.17 mm/min; n=14; Kruskal-Wallis test with Dunn post-hoc test, p=0.0004), carbachol 100µM & Atropine 10µM (3.00 ± 0.17 mm/min; n=8), or Atropine 10µM (3.20 ± 0.22 mm/min; n=9); right, propagation speed in deep layers in control (2.08 ± 0.14 mm/min; n=26), with carbachol 100µM (1.36 ± 0.14 mm/min; n=14; Kruskal-Wallis test with Dunn post-hoc test, p=0.0013), carbachol 100µM & Atropine 10µM (1.74 ± 0.16 mm²; n=8), or Atropine 10µM (1.96 ± 0.09 mm²; n=9). Horizontal bars represent medians. Values are reported as mean±SEM.

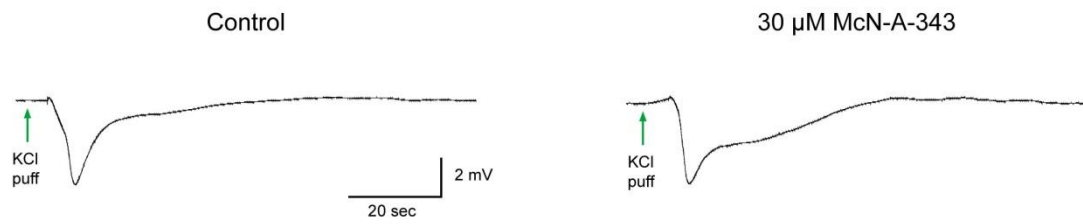
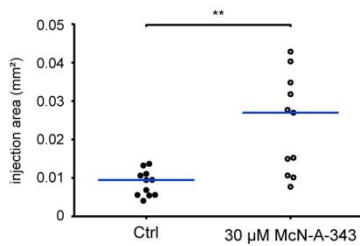
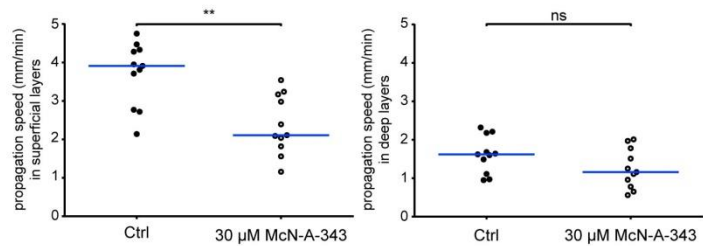
A**B1****B2**

Figure 5. Muscarinic activation inhibits CSD initiation and propagation. A. Representative LFP recordings of CSD in control and with the muscarinic agonist McN-A-343 (30 μ M), recorded in layer 3. B. McN-A-343 increased CSD threshold of ignition ($0.009\pm 0.001\text{mm}^2$ in control, $n=11$, $0.024\pm 0.004\text{mm}^2$ with McN-A-343, $n=11$; Mann Whitney test, $p=0.001$) and reduced CSD propagation speed in superficial layers ($3.71\pm 0.25\text{mm}/\text{min}$ in control, $n=11$, $2.37\pm 0.23\text{mm}/\text{min}$ with McN-A-343, $n=11$; Mann Whitney test, $p=0.001$); in deep layers there was a non-statistically significant trend towards reduction ($1.61\pm 0.14\text{mm}/\text{min}$, $n=11$ in control, $1.24\pm 0.15\text{mm}/\text{min}$, $n=11$, with McN-A-343; Mann Whitney test, $p=0.13$). Values are reported as mean \pm SEM.

References

- Ayata, C., Lauritzen, M., 2015. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev* 95, 953-993.
- Beltramo, R., D'Urso, G., Dal Maschio, M., Farisello, P., Bovetti, S., Clovis, Y., Lassi, G., Tucci, V., De Pietri Tonelli, D., Fellin, T., 2013. Layer-specific excitatory circuits differentially control recurrent network dynamics in the neocortex. *Nat Neurosci* 16, 227-234.
- Bock, A., Schrage, R., Mohr, K., 2018. Allosteric modulators targeting CNS muscarinic receptors. *Neuropharmacology* 136, 427-437.
- Dreier, J. P., Reiffurth, C., 2015. The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron* 86, 902-922.
- Edelstein, A. D., Tsuchida, M. A., Amodaj, N., Pinkard, H., Vale, R. D., Stuurman, N., 2014. Advanced methods of microscope control using muManager software. *J Biol Methods* 1.
- Ghoshal, A., Moran, S. P., Dickerson, J. W., Joffe, M. E., Grueter, B. A., Xiang, Z., Lindsley, C. W., Rook, J. M., Conn, P. J., 2017. Role of mGlu5 Receptors and Inhibitory Neurotransmission in M1 Dependent Muscarinic LTD in the Prefrontal Cortex: Implications in Schizophrenia. *ACS Chem Neurosci* 8, 2254-2265.
- Hedrich, U. B., Liautard, C., Kirschenbaum, D., Pofahl, M., Lavigne, J., Liu, Y., Theiss, S., Slotta, J., Escayg, A., Dihne, M., Beck, H., Mantegazza, M., Lerche, H., 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* 34, 14874-14889.
- Holthoff, K., Witte, O. W., 1996. Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. *J Neurosci* 16, 2740-2749.
- Jo, J., Son, G. H., Winters, B. L., Kim, M. J., Whitcomb, D. J., Dickinson, B. A., Lee, Y. B., Futai, K., Amici, M., Sheng, M., Collingridge, G. L., Cho, K., 2010. Muscarinic receptors induce LTD of NMDAR EPSCs via a mechanism involving hippocalcin, AP2 and PSD-95. *Nat Neurosci* 13, 1216-1224.
- Karatas, H., Erdener, S. E., Gursoy-Ozdemir, Y., Lule, S., Eren-Kocak, E., Sen, Z. D., Dalkara, T., 2013. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science* 339, 1092-1095.
- Kirkwood, A., Rozas, C., Kirkwood, J., Perez, F., Bear, M. F., 1999. Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine. *J Neurosci* 19, 1599-1609.
- Koga, K., Matsuzaki, Y., Honda, K., Eto, F., Furukawa, T., Migita, K., Irie, K., Mishima, K., Ueno, S., 2017. Activations of muscarinic M1 receptors in the anterior cingulate cortex contribute to the antinociceptive effect via GABAergic transmission. *Mol Pain* 13, 1744806917692330.
- Kurowski, P., Gawlak, M., Szulczyk, P., 2015. Muscarinic receptor control of pyramidal neuron membrane potential in the medial prefrontal cortex (mPFC) in rats. *Neuroscience* 303, 474-488.
- Lauritzen, M., 1994. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 117 (Pt 1), 199-210.

- Liautard, C., Scalmani, P., Carriero, 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.
- Lorincz, M. L., Gunner, D., Bao, Y., Connelly, W. M., Isaac, J. T., Hughes, S. W., Crunelli, V., 2015. A distinct class of slow (~0.2-2 Hz) intrinsically bursting layer 5 pyramidal neurons determines UP/DOWN state dynamics in the neocortex. *J Neurosci* 35, 5442-5458.
- Mantegazza, M., Cestele, S., 2018. Pathophysiological mechanisms of migraine and epilepsy: Similarities and differences. *Neurosci Lett* 667, 92-102.
- Mantegazza, M., Curia, G., Biagini, G., Ragsdale, D. S., Avoli, M., 2010. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 9, 413-424.
- Mitchelson, F. J., 2012. The pharmacology of McN-A-343. *Pharmacol Ther* 135, 216-245.
- Munoz, W., Rudy, B., 2014. Spatiotemporal specificity in cholinergic control of neocortical function. *Curr Opin Neurobiol* 26, 149-160.
- Pietrobon, D., Moskowitz, M. A., 2013. Pathophysiology of migraine. *Annu Rev Physiol* 75, 365-391.
- Pietrobon, D., Moskowitz, M. A., 2014. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci* 15, 379-393.
- Poorthuis, R. B., Enke, L., Letzkus, J. J., 2014. Cholinergic circuit modulation through differential recruitment of neocortical interneuron types during behaviour. *J Physiol* 592, 4155-4164.
- Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C., Eliceiri, K. W., 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* 82, 518-529.
- Schytz, H. W., Wienecke, T., Olesen, J., Ashina, M., 2010. Carbachol induces headache, but not migraine-like attacks, in patients with migraine without aura. *Cephalalgia* 30, 337-345.
- Schytz, H. W., Wienecke, T., Oturai, P. S., Olesen, J., Ashina, M., 2009. The cholinomimetic agent carbachol induces headache in healthy subjects. *Cephalalgia* 29, 258-268.
- Sprenger, T., Viana, M., Tassorelli, C., 2018. Current Prophylactic Medications for Migraine and Their Potential Mechanisms of Action. *Neurotherapeutics* 15, 313-323.
- Steriade, M., Amzica, F., Nunez, A., 1993. Cholinergic and noradrenergic modulation of the slow (approximately 0.3 Hz) oscillation in neocortical cells. *J Neurophysiol* 70, 1385-1400.
- Tang, Y. T., Mendez, J. M., Theriot, J. J., Sawant, P. M., Lopez-Valdes, H. E., Ju, Y. S., Brennan, K. C., 2014. Minimum conditions for the induction of cortical spreading depression in brain slices. *J Neurophysiol* 112, 2572-2579.
- Thorn, C. A., Popiolek, M., Stark, E., Edgerton, J. R., 2017. Effects of M1 and M4 activation on excitatory synaptic transmission in CA1. *Hippocampus* 27, 794-810.
- Tottene, A., Conti, R., Fabbro, A., Vecchia, D., Shapovalova, M., Santello, M., van den Maagdenberg, A. M., Ferrari, M. D., Pietrobon, D., 2009. Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)2.1 knockin migraine mice. *Neuron* 61, 762-773.

Vinogradova, L. V., 2018. Initiation of spreading depression by synaptic and network hyperactivity: Insights into trigger mechanisms of migraine aura. *Cephalalgia* 38, 1177-1187.

Wester, J. C., Contreras, D., 2013. Differential modulation of spontaneous and evoked thalamocortical network activity by acetylcholine level in vitro. *J Neurosci* 33, 17951-17966.

**PARTIE 3 – EFFET DE
L'INVALIDATION DES CANAUX
TRESK SUR L'INDUCTION DE
LA DCE**

Introduction

Migraine with aura is a common disorder characterized by temporary disabling attacks of severe head pain and transient and reversible neurological disturbances, mostly visual, called aura (68).

Studies of mutations causing a rare, monogenic and autosomal form of migraine with aura, FHM, have allowed investigations of some pathogenic mechanisms of migraine. Three genes involved in FHM had been identified, *CACNA1A*, *ATP1A2* and *SCN1A*, coding for the voltage-gated calcium channel Cav2.1, the glial Na⁺-K⁺ ATPase and the voltage-gated sodium channel Nav1.1, respectively. In mouse models of FHM 1 and 2, it has been shown a facilitation of CSD. Thus, these results have suggested that ion channels can be involved also in pathological mechanisms of typical forms of migraine with aura.

A mutation of the *KCNK18* gene, coding for the two-pore domain potassium channel (K2P) TRESK (TWIK-related spinal cord K channel) that is highly expressed in sensory neurons, has been identified in a large family and co-segregated with a typical migraine with aura phenotype (25). The mutation causes a 2-bp frame shift mutation (F139WfsX24) that induces a premature truncation of the TRESK ('TRESK-MT') protein. It has been shown that TRESK-MT is a dominant negative mutant that functionally downregulates wild-type TRESK channels (25) and induce hyperexcitability of trigeminal (TG) neurons (64, 69). However, a further genetic screening study identified another missense TRESK variant, C110R, in both migraine patients and unaffected subjects (Andres-Enguix et al., 2012). TRESK-C110R, similar to TRESK-MT, exerts a dominant-negative effect on WT-TRESK in heterologous cells, but expression of this mutant was found to have no effect on TG excitability (Guo et al., 2014), consistent with its identification in unaffected subjects.

Royal et al 2019 (60) showed that the F139WfsX24 frame shift mutation induced a downstream alternative translation initiation site, thus leading to the production of a second protein fragment, TRESK-MT2. This second protein fragment co-assembles with and inhibits TREK1 and TREK2, two other K⁺ channels of the two-pore-domain family, to increase trigeminal sensory neuron excitability, leading to a migraine-like phenotype in rodents. TRESK-C110R does not show this dominant negative effect on TREK1 and TREK 2. Double KO TREK1^{-/-}-TREK2^{-/-} mice show increased excitability of TG neurons and facial allodynia, commonly linked to a migraine phenotype, suggesting their involvement in migraine pathological mechanisms, particularly in migraine pain.

Thus the TRESK mutation could cause migraine with aura because of its dominant negative effect on TREK1 and TREK2 channels, leading to hyperexcitability of TG

neurons. However, patients carrying this mutation have migraine with aura, which has been linked also to a central mechanism. Migraine pathophysiology is complex and include dysfunctions of cortical network excitability due to an impairment of the excitation-inhibition balance leading to neuronal hyperexcitability (63). In particular, cortical spreading depression (CSD) is a central mechanism of migraine. CSD is a wave of rapid depolarization and hyperexcitability of cortical cells, which self-propagates slowly across the hemisphere at a rate of 2-5mm/min; it is followed by a depression of neuronal firing (29). In an uninjured and normoxic brain, CSD is the cause of the migraine aura and has been involved in the generation of migraine headache (70). CSD is associated with, increased extracellular K^+ concentration, and excitatory neurotransmitter glutamate release, and cortical cell swelling.(11).

TRESK, TREK1 and TREK2 channels are expressed also in the neocortex (65, 66) and TRESK-MT could be involved in CSD generation through its dominant negative action on TREK1 and TREK2 channels. We hypothesized that, besides hyperexcitability of TG neurons, TRESK-MT could induce also central effects involved in CSD generation. Thus, we asked if CSD is facilitated in double KO TREK1/2 mice (61), igniting CSD with focal applications of 130mM KCl and evaluating threshold of induction and propagation properties.

Methods

Animal care and mouse lines

All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. Experiments were carried out according to the European directive 2010/63/UE and approved by institutional and ethical committees (approval #C06-152-5). Animals were group-housed (5 mice per cage, or 1 male and 2 female per cage for breeding) on a 12h light/dark cycle, with water and food ad libidum. C57BL6/J mice were purchased from Charles River (CRL, France)

Preparation of slices, electrophysiological recordings and CSD threshold quantification

Acute coronal slices (400 μ m) were prepared from 30-40 day-old C57BL/6J mice of both sexes, in ice cold standard ACSF saturated with 95% O₂ - 5% CO₂. Slices were then transferred in a submerged chamber (31°C), where they were allowed to recover at least one hour before recording. Composition of ACSF (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃ and 25 Glucose.

Procedure

Slices were placed in a submerged recording chamber mounted in a microscope and perfused with a modified ACSF (33°C, 2.9ml/min). Composition of mACSF (in mM): 125 NaCl, 3.5 KCl, 1 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃ and 25 Glucose (18).

Cortical spreading depression was induced in somatosensory cortex by brief pulses of KCl 130mM (0.1% Fast Green was used to monitor the area of injection) in superficial neocortical layers (L2-3) with a glass micropipette (2-4 M Ω) connected to an air pressure injector (Pneumatic PicoPump PV820). The area of injection was increased by repeated injections until the induction of CSD, which defined the CSD threshold.

DC field potentials were recorded using glass micropipettes (2-4 M Ω) filled with mACSF, and located at least 500 μ m away from the CSD induction area. Extracellular recordings were acquired with a Multiclamp 700B amplifier (Molecular devices). Modifications of light transmittance (intrinsic optical signal) were monitored using a high-sensitivity CCD camera, recorded with MicroManager and quantified with ImageJ.

Image analysis with ImageJ-Fiji was used for identifying the CSD wave by intrinsic optical imaging. Image processing was performed to evaluate the CSD threshold and to quantify CSD propagation speed with a custom made macro (available at <https://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/scripts/imagej.htm>). To eliminate the background and

isolate the wave from the raw image, a representative image acquired before the KCl injection was subtracted from the others and then white and black contrast was enhanced (0.35 AU). To determine the velocity of the propagating wave, successive line plots of the wave front from processed images (every 2 seconds) were drawn and the spatial distances between them were quantified by means of the peak finder ImageJ plugin.

Statistical analysis

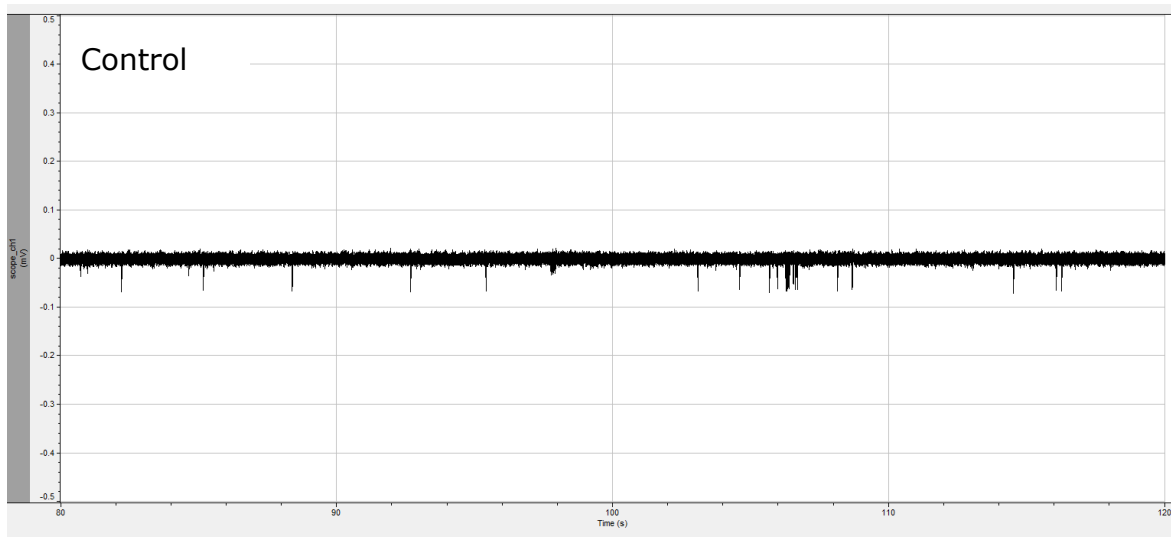
All experiments were performed on at least 3 animals. Statistical tests were performed with Prism 5 (GraphPad, USA). Statistical comparisons were performed with the two-tailed non parametric Mann-Whitney U tests . Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

For this study, 4 male mice of each group (TREK1/2 KO & WT) have been used.

Cortical spreading depression can be induced by injections of concentrated KCl in the brain tissue, in vitro and in vivo. We used 130mM KCl to induced CSD in the neocortex of mouse brain slices, a concentration that is within pathophysiological limits. Electrophysiological LFP recordings of CSD shows a typical CSD profile already documented previously, with a negative DC shift composed by a first rapid initial phase and a slower later phase with return to the baseline level. Before the induction of CSD, the spontaneous network activity was recorded.

The double invalidation of TREK1 & TREK2 did not affect the spontaneous activity. In fact, LFP recordings in layer 3 showed sparse population spike activity in both control and TREK1/2 KO slices.



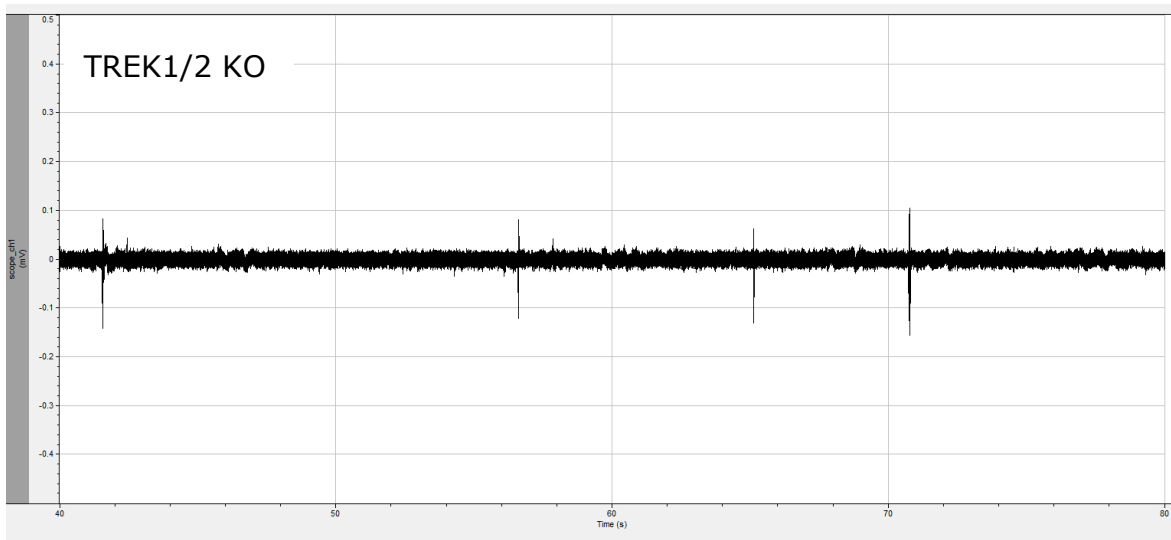


Figure 34 Local field potential recording in neocortex (Layer 3) of wild-type mouse (up) and TREK1/2 KO mouse (bottom), showing sparse spontaneous activity in both conditions.

To identify the possible effect of TREK1/TREK2 invalidation on CSD susceptibility, we increased the area of 130 mM KCl solution injected in the neocortex, until the induction of CSD.

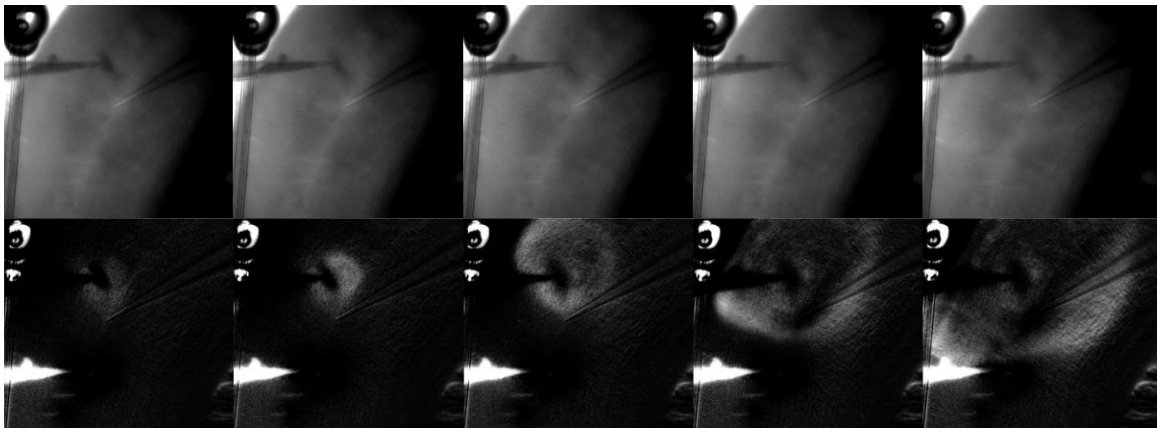


Figure 35 Representative image sequence of CSD induced by KCl 130 mM injection in the neocortex (Layer 3); each image is separated by 5 seconds. The upper line is raw recording; the bottom line is the imageprocessed, to better identify the CSD frontwave and follow its propagation.

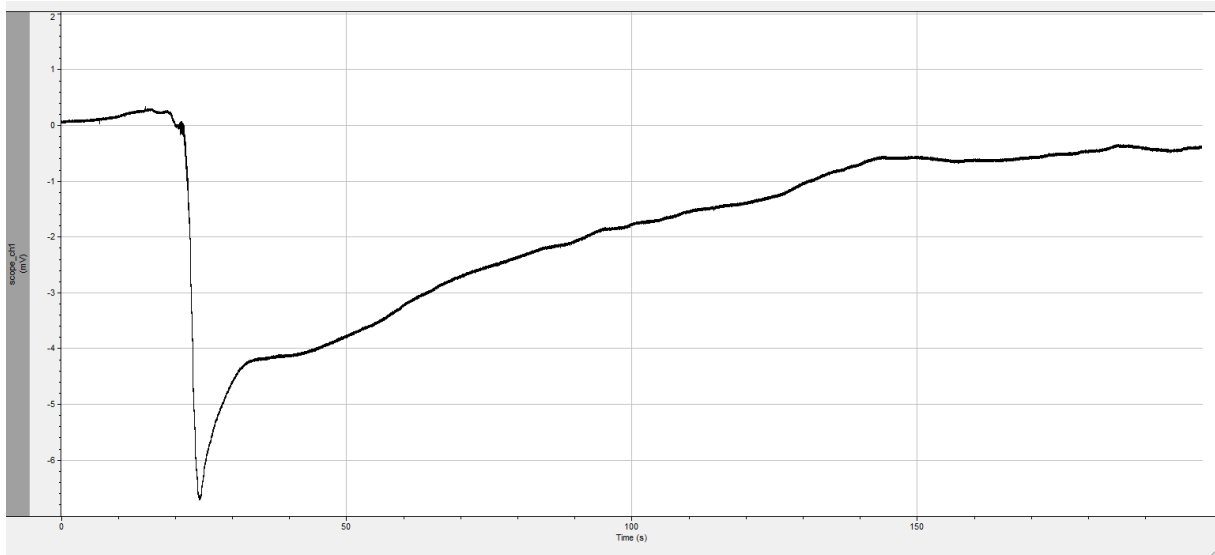


Figure 36 Representative trace of LFP recording of CSD induced by KCl 130 mM injection in the layer 3 of the neocortex (x axis is seconds; y axis is mV).

In the WT group the mean area of injection needed to induce CSD was $8992 \pm 896.8 \mu\text{m}^2$, while in the TREK1/2 KO group the mean value was $7625 (\pm 902.1 \mu\text{m}^2$. Statistical analysis did not revealed any significant difference (Mann Whitney test, $p=0.1407$, $n(\text{WT})=19$, $n(\text{TREK1/2 KO})=18$) between the two groups.

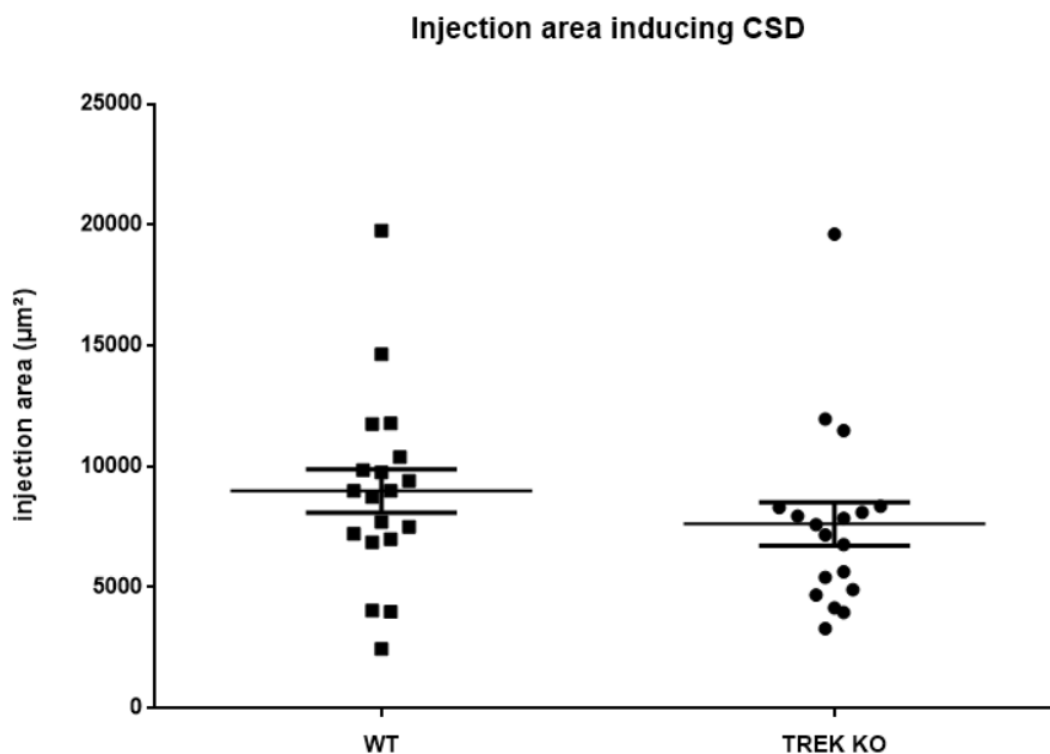


Figure 37 Comparison of CSD threshold between WT and double TREK1/2 KO; horizontal lines represent mean \pm SEM

We analysed the effect of the double inactivation of TREK1 and 2 on the propagation speed. The mean value of the WT group was $3.66 \pm 0.1457 \text{ mm/min}$, while the mean value in the TREK1/2 KO group was $3.546 \pm 0.1214 \text{ mm/min}$. The statistical analysis did

not show a significant difference (Mann Whitney test, $p=0.6698$, $n(\text{WT})=20$, $n(\text{TREK1/2 KO})=18$).

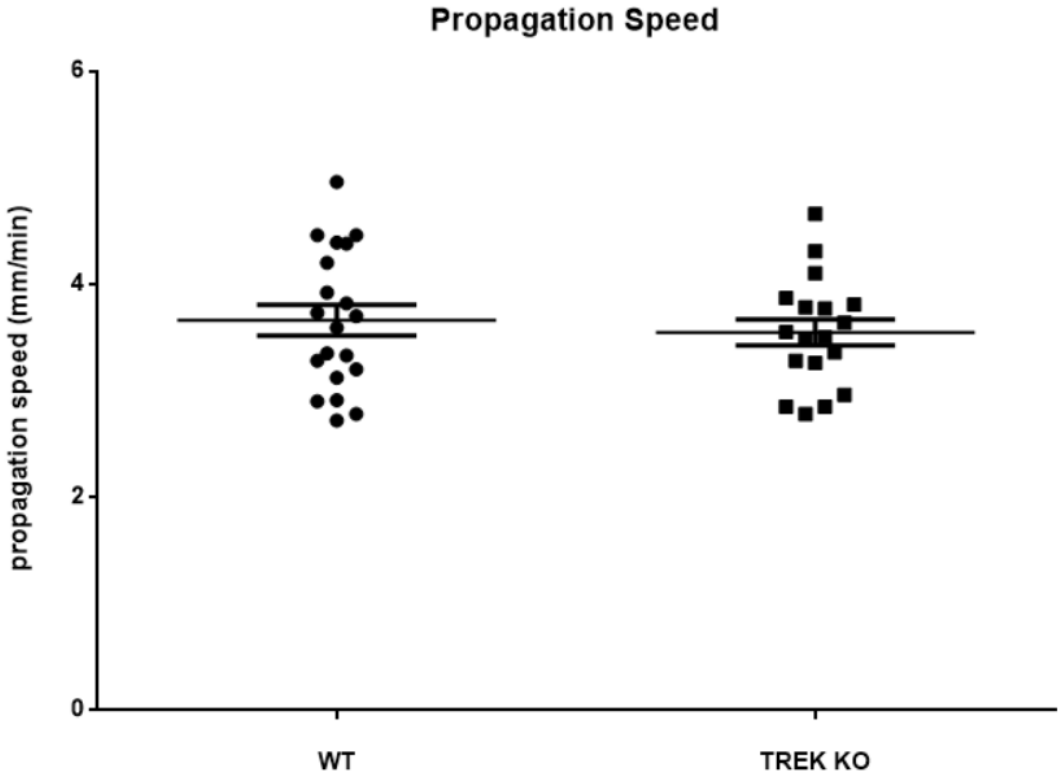


Figure 38 Comparison of CSD propagation speed between WT and double TREK1/2 KO; horizontal lines represent mean +/- SEM.

Thus, our results did not reveal any effect of the mutation on the susceptibility of CSD induction.

Discussion

In this study we have investigated the effect of TREK1 and TREK2 channels invalidation on CSD induction in neocortical brain slices. We did not observe any modification of the spontaneous network activity, nor of CSD susceptibility.

TRESK protein is highly expressed in DRG and TG neurons, in the peripheral nervous system. In the CNS, TRESK is also expressed in the adult rat brain, mainly in the internal structures as the dentate gyrus, amygdala, and hippocampus. In the neocortex, TRESK can be found in layers 2 to 6 of the somatosensory cortex (67), and TRESK expression levels are higher in the layer 2 than in layers 3 to 6.

Like TRESK channel, TREK1 and TREK2 protein are expressed in TG neurons, but also in the CNS, both in the neocortex and in the internal structures. The levels of TREK2 expression are lower than those of TREK1 (65, 66).

Hervieu et al (2001) showed that TREK1 is not expressed in the neocortex layers 2 and 3, but TREK2 is present even if at low levels. On the contrary, in the layer 4 of the neocortex, TREK1 is highly expressed, whereas TREK2 has a smaller level of expression.

Royal et al 2019 found that TRESK channel interact with TREK1 and TREK2 in TG neurons, and the TRESK-MT mutant had a dominant negative effect on the expression of TREK1 and TREK2. The invalidation of TREK1 and TREK2 leads to hyperexcitability of TG neurons, and facial allodynia in adult rats.

In the CNS, there is no information about TRESK, TREK1 and TREK2 interactions (e.g. if there are expressed in the same cells). Moreover, TRESK-MT mutant may have a dominant negative effect on other K₂P channels, other than TREK 1 & 2 expressed in the neocortex. Our results show that the absence of TREK1 and TREK2 does not modify the properties of CSD. This suggests a more complex mechanism for the generation of migraine aura by the TRESK-MT mutant.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme d'induction de la Dépression Corticale Envahissante, ainsi qu'une nouvelle voie de modulation de l'excitabilité corticale et de la DCE.

Rôle du Nav1.1 et des neurones GABAergiques dans l'induction de la DCE

La forme rare et monogénique de Migraine avec aura, appelée Migraine Hémiplégique Familiale, est causée par la mutation de trois gènes bien distincts : CACNA1 (pour le canal Ca_v2.1), ATPA1A (pour la sous unité alpha 2 de la pompe NaK ATPase) et SCN1A (pour le canal Nav1.1).

L'étude des modèles de souris de MHF 1 (mutation gain de fonction du Cav_{2.1}) et de MHF 2 (mutation perte de fonction de Na-K-ATPase), confirme l'implication primordiale du Glutamate et du Potassium dans l'initiation de la DCE. Le type 3 de MHF est du à des mutations du Nav_{1.1}, un canal sodique dépendant du potentiel, majoritairement exprimé dans les neurones GABAergiques où ils sont très importants pour leur excitabilité.

Plusieurs études menées dans notre laboratoire ont montré sur neurones transfectés en culture qu'il s'agissait d'une mutation gain de fonction, entraînant une augmentation de l'excitabilité des neurones. Cependant, le lien entre cette mutation, l'hyperexcitabilité corticale et la facilitation de la DCE – déjà observée dans les autres modèles de FHM – ou le phénotype de Migraine FHM reste inconnu.

Tout d'abord, en nous basant sur la mutation gain de fonction du canal Nav_{1.1} qui provoque la Migraine Hémiplégique Familiale de type 3, et l'hyperexcitabilité observée dans des neurones transfectés avec le canal muté, nous avons émis l'hypothèse qu'une suractivation des neurones GABAergiques ou des canaux Nav_{1.1}, est capable d'induire une hyperexcitabilité de réseau menant à une DCE.

Pour exploiter cette hypothèse de travail, nous avons utilisé deux approches expérimentales : une approche pharmacologique pour activer sélectivement les canaux Nav_{1.1} grâce à une toxine d'araignée, et une approche optogénétique pour suractiver les neurones GABAergiques.

Rôle du Nav1.1

Des premières études ont montré que la neurotoxine Hm1a à fortes concentrations a un effet bloqueur des canaux potassiques dépendant du potentiel K_v2 et K_v4 (54). A plus faibles concentration, son effet devient limité sur ces canaux et commence à présenter

une sélectivité aux canaux sodiques Nav1.1 et Nav1.2 (Osteen et al, 2016). Notre propre étude montre que la toxine est sélective au canal Nav1.1 à 10 nM, avec un effet activateur très limité sur le canal Nav1.2. L'isoforme 1.2 n'étant que très faiblement exprimé chez l'adulte et à l'âge des souris utilisées dans l'étude, l'effet potentiel de la toxine sur cet isoforme reste très limité.

Les enregistrements de current clamp avec la technique du patch clamp en cellule entière, montre que les neurones GABAergiques sur tranches de néocortex présentent une hyperexcitabilité induite par la perfusion de la toxine. La toxine entraîne une augmentation du courant persistant, similaire à celle observée dans les neurones transfectés avec le canal muté MHF3. Grâce à la neurotoxine Hm1a, il a été possible d'induire une DCE par sa simple perfusion dans la solution extracellulaire. Ceci nous a permis de confirmer une première partie de notre hypothèse selon laquelle la suractivation des canaux Nav1.1 est suffisante pour induire une DCE.

Dans l'étude menée par Richards et al (2018) sur souris du modèle d'épilepsie génétique syndrome de Dravet (knock-out hétérozygote Nav1.1), la toxine restaure la fonction des interneurons GABAergiques du CA1 dans l'hippocampe de souris du modèle, tout en n'ayant pas d'effet sur les neurones Glutamatergiques. De plus le traitement, in vivo, des souris de ce modèle avec la toxine, réduit l'hyperexcitabilité visible en ECoG. Cependant, de façon surprenante, la toxine ne montre aucun effet sur l'excitabilité des neurones GABAergiques du CA1 de souris WT.

Nous avons donc surveillé, en plus du néocortex, les structures internes sous corticale présentant une forte proportion de neurones GABAergiques, le striatum et l'hippocampe. Les tranches ayant présenté une induction de la DCE, n'ont montré aucun déclenchement de dépression envahissante dans les deux structures sous corticales. Ceci laisse suggérer un effet différentiel de la toxine sur les canaux Nav1.1 exprimés dans les structures sous corticales ou une organisation différente du réseau neuronal.

A partir de ces résultats il devient intéressant de se pencher sur les neurones Glutamatergiques du néocortex et leur activité pendant la perfusion de la toxine. Les canaux Nav1.1 ne sont que très faiblement exprimés dans les neurones glutamatergiques, leur hyperexcitabilité nécessaire à l'installation de l'hyperexcitabilité de réseau menant à l'induction de la DCE ne se fait donc pas directement et peut s'installer de façon retardée par rapport aux neurones GABAergiques. Ceci permettrait d'esquisser une chronologie dans le processus menant à l'hyperexcitabilité de réseau et finalement à l'induction de la DCE.

Nous avons aussi étudié l'influence de l'activation des Nav1.1 par la toxine sur la sensibilité d'induction de la DCE par injection de KCl 130 mM. Il s'agit d'un modèle d'induction non spécifique, visant à augmenter de façon conséquente l'excitabilité des neurones, tous types confondus, afin de créer une hyperexcitabilité locale à l'origine de la DCE. De façon surprenante, malgré l'activation par la toxine, la recherche de seuil qui permet de déterminer la sensibilité à la DCE, échoue à montrer une facilitation de son induction. En effet, notre hypothèse était que l'activation des canaux Nav1.1 permet l'installation d'une hyperexcitabilité, et donc une augmentation de la concentration extracellulaire de K⁺, qui faciliterait l'induction de la DCE par injection de potassium.

L'injection d'une solution hautement concentrée en potassium est un des modèles répandus d'induction de la DCE. La majorité des études utilisant ce modèle d'induction bien caractérisé, appliquent des concentrations entre 1 et 2 M, qui ne sont proches ni de la physiologie ni de la pathophysiologie, mais qui sont efficaces pour une induction reproductible de DCE. Notre choix de 130 mM repose sur le fait que cette concentration peut être retrouvée en condition physiopathologique dans le cas où des neurones libéreraient le contenu intracellulaire ($[K^+]_{int} = 155 \text{ mM}$).

Si cette technique permet dans la majorité des cas, une étude simple et efficace de la facilitation de la DCE, elle pourrait manquer de sensibilité de part la forte concentration en KCl injectée. Nous avons montré (voir dans la partie « rôle des neurones GABAergiques ») qu'une application focale et lente de KCl 12 mM est capable d'induire une DCE. Ce modèle d'induction bien plus proche de la physiopathologie pourrait être utilisé pour compléter les résultats, et révéler un effet de la toxine.

Une étude in vivo serait bien entendu important pour compléter notre étude. Deux types d'expériences pourraient être envisageables :

- L'application focale et aiguë de la toxine sur le cortex et l'enregistrement en potentiel de champ de l'induction de DCE spontanée, ou
- l'infusion de la toxine dans le cerveau par une injection dans les ventricules et l'enregistrement continu en Potentiel de Champ ou ECoG de la survenue de DCE spontanée, afin de confirmer notre modèle in vivo.

Rôle des neurones GABAergiques

L'induction de la DCE par la suractivation des canaux Nav1.1 n'est pas systématique (23% de succès) et nécessite un certain temps d'incubation (15 minutes en moyenne). La caractérisation de la DCE induite de la sorte est délicate. Il est possible de mimer l'hyperactivation des neurones GABAergiques en les stimulant spécifiquement. La stimulation optogénétique des neurones GABAergiques, déclenche une DCE, en moins d'une minute trente.

Bien que l'hyperactivation massive de ces neurones par l'optogénétique n'est pas très physiologique, elle présente l'avantage d'être efficace (85% de succès), rapide (<90 sec) tout en restant spécifique et restreinte aux neurones GABAergiques.

Cette approche expérimentale nous a permis de caractériser un nouveau modèle de DCE, qui diffère des modèles de DCE déjà connus et caractérisés. Bien que les études tendent à diverger à ce sujet, la littérature montre que la transmission synaptique glutamatergique est indispensable ou au moins nécessaire à l'induction de la DCE par injection de potassium concentré ou par stimulation électrique. L'incubation des tranches avec des antagonistes NMDA et non NMDA n'inhibe pas l'induction de la DCE, le taux de succès restant similaire à celui d'une condition contrôle. Bloquer la transmission synaptique excitatrice et/ou inhibitrice ne modifie en rien l'induction de la DCE, suggérant que notre modèle d'induction ne nécessite pas de transmission synaptique.

L'enregistrement des variations de concentrations extracellulaires en potassium lors d'une stimulation optogénétique et induction de DCE a montré une augmentation progressive dès le début de la stimulation jusqu'à arriver à une concentration critique (~12mM) où se déclenche la DCE. Par ailleurs, l'injection progressive de 12 mM de KCl dans le néocortex, est capable d'induire une DCE.

Dans la littérature, une étude d'induction de DCE par injection de potassium sur tranches de néocortex, montre qu'une perfusion d'une solution extracellulaire concentrée en potassium (« bath application »), induit une DCE sans être inhibée par le blocage de la transmission synaptique excitatrice. La surface de néocortex illuminé en optogénétique (dans le cas où l'illumination spatiale n'est pas utilisé), englobe la presque totalité d'un hémisphère ; si la stimulation optogénétique des neurones GABAergiques entraîne une augmentation de la libération de potassium, cette accumulation extracellulaire pourrait s'apparenter à un « bath application » de potassium de plus en plus concentrée, jusqu'à induire la DCE.

La libération de potassium dans le milieu extracellulaire se fait grâce aux potentiels d'action générés par les neurones activés par l'optogénétique. L'excitabilité des neurones

est donc nécessaire. Par ailleurs, l'incubation de TTX qui bloque tous les canaux Nav et donc empêche la génération de PA, empêche l'induction de la DCE. Cependant la TTX bloque tous les neurones, excitateurs et inhibiteurs confondus, et manque de sélectivité.

Pour cibler l'excitabilité des neurones GABAergiques précisément, nous avons utilisé une lignée de souris présentant une invalidation des canaux Nav1.1 (Dravet/SMEI) et une hypoexcitabilité des neurones GABAergiques entraînant une hyperexcitabilité de réseau. Nous avons croisé ces souris avec des souris VGAT-cre et Chr2 pour obtenir des souris possédant des neurones GABAergiques sensibles à l'optogénétique et présentant une hypoexcitabilité liée à l'invalidation du Nav1.1.

L'activation optogénétique des neurones GABAergiques des souris SMEI ne permet pas dans ces conditions d'induire des DCE avec les mêmes taux de succès que chez les souris « VGAT-ChR2 » saines. En effet il devient plus difficile de générer une DCE. Les neurones GABAergiques étant hypoexcitables, leur activation par optogénétique pourrait dans ce cas rétablir une forme d'excitabilité proche et légèrement supérieure à celle des conditions contrôle. En se basant sur les variations de K^+ extracellulaire observées pendant la stimulation et l'induction de la DCE, il est possible de suggérer que l'activation des neurones GABAergiques présentant la mutation ne permet pas une accumulation du K^+ extracellulaire aussi efficace que celle observée en condition contrôle.

Cette hypothèse est soutenue par le rétablissement des taux de succès à des valeurs proches de celles de la condition contrôle lorsque la concentration en K^+ dans la solution extracellulaire (ACSFm) est augmentée de façon à se rapprocher des valeurs critiques pour l'induction de la DCE. Pour compléter ces résultats, il serait intéressant de mesurer les variations de la concentration en K^+ extracellulaire pendant l'induction de la DCE sur des tranches de néocortex de souris issues du croisement SMEI x VGAT-ChR2. En effet puisque l'excitabilité des neurones GABAergiques est réduite, leur activation par optogénétique permettrait une libération de K^+ extracellulaire moins conséquente et une accumulation moins rapide jusqu'à arriver aux valeurs critiques pour l'induction de la DCE, voire ne jamais atteindre ces valeurs pour les tranches qui faillent à l'induire.

Ces résultats ont pu confirmer l'importance de l'excitabilité des neurones GABAergiques dans le déclenchement de la DCE par leur suractivation sélective, en particulier l'importance de la libération du K^+ dans le milieu extracellulaire qui supplante le rôle de la transmission synaptique excitatrice (et inhibitrice). Nos expériences d'induction de DCE par optogénétique avec une perfusion de solution extracellulaire moins concentrée en Potassium et plus en magnésium, montrent une tendance (non significative) à induction moins facile qu'en condition contrôle. Bien que ces expériences montrent que l'induction

est possible, elles suggèrent aussi que la concentration en potassium joue un rôle dans l'induction de la DCE.

Nous avons montré aussi que la suractivation des canaux Nav1.1 par la toxine facilitait l'induction de la DCE par l'activation des neurones GABAergiques. En nous basant sur l'étude de Richards et al (2018) menée sur des souris invalidée pour le canal Nav1.1, et sur nos expériences d'induction de DCE par optogénétique sur cette même lignée, il serait important d'étudier dans le néocortex, si l'activation des Nav1.1 par la toxine permet de restaurer les taux de succès à des valeurs similaires à une condition contrôle (souris non KO sensibles à l'optogénétique).

Ceci permettrait de confirmer la place de la suractivation des Nav1.1 à la tête du processus menant à l'induction de la DCE, au cours duquel l'hyperexcitabilité des neurones GABAergiques favorise la libération de K⁺ dans le milieu extracellulaire qui va à son tour rendre les neurones glutamatergiques plus excitables, installer une hyperexcitabilité de réseau qui mènera à des concentrations critiques de K⁺ extracellulaires favorables à l'induction de la DCE.

En conclusion, en nous basant sur la pathologie et les mutations retrouvées dans le cas de la MHF 3, notre étude a permis de mettre en évidence un nouveau modèle d'induction de la DCE. L'exploration de ce nouveau modèle permet de nous éclairer sur les différents mécanismes qui pourraient être impliqués dans le mécanisme physiopathologique de la migraine.

Modulation muscarinique de la Dépression Corticale Envahissante

Nous avons présenté plus haut que la modulation muscarinique est largement étudiée et utilisée pour moduler l'excitabilité de réseau dans le cerveau épileptique. Compte tenu des traits communs entre les phénotypes migraineux et épileptiques du point de vue de l'excitabilité neuronale, nous avons cherché à déterminer quel rôle pourrait avoir l'action de l'acétylcholine et de l'activation de la voie muscarinique sur l'hyperexcitabilité liée à la DCE. De plus, les quelques études menées sur l'action de l'acétylcholine et des agonistes cholinergiques sur un phénotype migraineux, ne se focalisaient que sur la modulation vasculaire. Le but de cette étude était de déterminer si l'activation de la voie

cholinergique, et muscarinique en particulier, était capable d'influencer la sensibilité à la DCE, révélant ainsi une nouvelle voie d'investigation de la DCE.

La perfusion des tranches de néocortex avec l'agoniste cholinergique Carbachol a révélé plusieurs points très intéressants et pertinents.

Tout d'abord, comme il est retrouvé dans la littérature, l'activation des récepteurs cholinergiques (nicotiniques et muscariniques) entraîne le développement d'activités de réseau bien particulières appelées UP/DOWN states qui se caractérisent par une alternance d'état d'activation HAUT et BAS à un rythme lent (entre 0.2 et 1 Hz). Ces oscillations lentes sont observées dans le cortex pendant le sommeil ou l'anesthésie. Les conditions expérimentales dans lesquelles se trouvent les tranches de néocortex s'apparentent à celles décrites plus haut. En effet, les tranches coronales de cerveau coupent les connexions que le cortex fait avec le reste de l'encéphale et du système sensoriel, et donc ne reçoit aucune stimulation extérieure, un état similaire à celui d'une anesthésie.

En l'absence de Carbachol, les tranches ne présentent aucune activité UP/DOWN ; ce « silence » peut être relié à deux faits : l'épuisement des réserves d'acétylcholine dans les neurones du néocortex, et le non renouvellement de ces réserves puisque la solution extracellulaire de perfusion n'en contient pas. L'apport de Carbachol permet l'apparition dans le cortex somato-sensoriel, au niveau du cortex « barrel » en couche 5-6, des oscillations lentes UP/DOWN.

Ensuite de façon surprenante, l'activation de la voie cholinergique inhibe l'induction de la Dépression Corticale Envahissante. Le modèle d'induction de DCE par l'injection de solution concentrée en KCl est suffisamment sensible dans ce cas pour révéler l'effet inhibiteur du Carbachol. De plus, lorsque l'on bloque la voie muscarinique avec l'Atropine, le Carbachol ne présente plus son effet inhibiteur, confirmant ainsi l'implication de la voie muscarinique dans l'inhibition de la DCE, et l'indépendance de celle-ci vis-à-vis de l'activation de la voie nicotinique.

Dans les études visant à déterminer le rôle de la voie muscarinique dans des pathologies du SNC, le récepteur m1 est le plus généralement la cible des études pharmacologiques.

Nous avons donc utilisé l'agoniste muscarinique présentant la plus forte affinité pour m1 par rapport aux autres membres des mAChR.

La perfusion de l'agoniste m1 McN-A-343 n'induit pas d'oscillations lentes UP/DOWN comme observées dans des conditions de perfusion de Carbachol, suggérant soit que la concentration en McN-A-343 n'est peut-être pas suffisante pour engendrer ces états, soit que ces oscillations peuvent être modulées par les autres types de AchR. Cependant, il est suffisant pour inhiber de façon similaire l'induction de la DCE. Ceci suggère ainsi que l'activation de la voie muscarinique à travers l'activation des récepteurs m1 peut moduler l'induction de la DCE.

Il serait intéressant d'investiguer l'implication de l'activation des récepteurs m5 dans la modulation de l'induction de la DCE, avec peut-être une expérience de co-activation des récepteurs m1 et m5.

Il est surprenant que l'activation d'un état tel que le UP/DOWN State caractérisé par la présence d'une période de haute activité synaptique et de décharges de potentiels d'action, entraîne l'inhibition d'un phénomène engendré par une hyperexcitabilité et hyperactivité du réseau neuronal tel que la DCE.

Le modèle d'induction de la DCE utilisé dans notre étude est l'injection d'une solution concentrée en potassium. Dans ce modèle d'induction, il a été montré une forte participation de la transmission synaptique glutamatergique, puisque l'application d'antagonistes bloquent ou inhibent l'induction de la DCE (pour revue, Pietrobon & Moskowitz, 2014). La stimulation électrique à haute fréquence répétée induit une facilitation et accélération de la DCE induite par KCl qui peut durer plusieurs jours (Fregni et al, 2015).

Si la stimulation à haute fréquence est capable d'induire une potentialisation à long terme et augmenter l'efficacité de la transmission synaptique, ceci pouvant non seulement faciliter l'induction de la DCE, il serait cohérent de suggérer qu'une dépression à long terme, donc une perte de l'efficacité de la transmission synaptique excitatrice, pourrait inhiber voir bloquer l'induction de la DCE. Il existe plusieurs formes de LTD, dont la LTD muscarinique qui peut être induite par le Carbachol et empêchée par des antagonistes muscariniques. Ghosal et al (2017) montrent que la co activation des récepteurs mACh de type m1 et des récepteurs mGluR5 entraîne une LTD, et une

augmentation de l'inhibition des neurones excitateurs. Si les neurones excitateurs sont moins excitable dans notre cas, la DCE est donc inhibée.

L'installation de l'état UP/DOWN et donc d'une période de forte activités synaptiques dans le cortex, pourrait aussi entraîner un épuisement temporaire en neurotransmetteur Glutamate dans les vésicules des neurones excitateurs, menant aussi à perte de l'efficacité de la transmission synaptique. En effet, si la plupart des études sur tranches de néocortex ou d'hippocampe impliquant le carbachol utilisent des protocoles de perfusion de maximum 15 minutes, nos conditions expérimentales impliquent une longue période de pré incubation préalable et un temps d'adaptation (10 minutes) des tranches dans la chambre d'enregistrement. Ce qui amène à près de 40 minutes de perfusion avec le Carbachol ou l'agoniste m1. Cette longue exposition à l'action des agonistes cholinergiques pourrait permettre l'installation de phénomènes tels qu'un épuisement des réserves en glutamate ou une dépression à long terme. Pour confirmer cette hypothèse il serait intéressant d'utiliser un protocole avec des temps d'incubation moins long et observer si l'inhibition de la DCE est toujours possible.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence une nouvelle voie de modulation de la DCE, impliquant l'activation de la voie muscarinique. Cette activation entraîne une inhibition de l'induction de la DCE mais aussi de sa propagation. L'existence d'induction « avortée » de DCE ajoute un intérêt à cette voie de modulation. Puisque la DCE est le corrélat électrophysiologique de l'aura de migraine et que des études tendent à montrer un lien entre la DCE et la sensibilisation de la voie TG, l'inhibition partielle voire totale de la DCE, et donc de l'aura de migraine, ouvre de nouvelles possibilités de recherche de traitement préventifs de la migraine avec aura.

Références bibliographiques

1. Lim L, Mi D, Llorca A, Marín O (2018) Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron* 100(2):294–313.
2. Lőrincz ML, et al. (2015) A Distinct Class of Slow (~0.2–2 Hz) Intrinsically Bursting Layer 5 Pyramidal Neurons Determines UP/DOWN State Dynamics in the Neocortex. *J Neurosci* 35(14):5442–5458.
3. Steriade M, Dossi RC, Contreras D (1993) Electrophysiological properties of intralaminar thalamocortical cells discharging rhythmic (~40 HZ) spike-bursts at ~1000 HZ during waking and rapid eye movement sleep. *Neuroscience* 56(1):1–9.
4. Catterall WA (2017) Forty Years of Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Epilepsy. *Neurochem Res* 42(9):2495–2504.
5. Wei F, et al. (2017) Ion Channel Genes and Epilepsy: Functional Alteration, Pathogenic Potential, and Mechanism of Epilepsy. *Neurosci Bull* 33(4):455–477.
6. Israel MR, Tay B, Deuis JR, Vetter I (2017) Chapter Three - Sodium Channels and Venom Peptide Pharmacology. *Advances in Pharmacology, Ion Channels DownUnder.*, eds Geraghty DP, Rash LD (Academic Press), pp 67–116.
7. Catterall WA (2011) Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(8):a003947.
8. Silberstein S, Goadsby P (2002) Migraine: Preventive Treatment. *Cephalalgia* 22(7):491–512.
9. Understanding Headaches and Migraines - Mark Forshaw - Google Livres Available at: https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=MxiKiNxEqvsC&oi=fnd&pg=PR5&dq=forshaw+2004+migraine+aura&ots=MR1kPOHH6g&sig=joNDci1z63-VybKvijJ2W__ytbo#v=onepage&q=forshaw%202004%20migraine%20aura&f=false [Accessed April 1, 2019].
10. Robbins L (1994) Precipitating Factors in Migraine: A Retrospective Review of 494 Patients. *Headache J Head Face Pain* 34(4):214–216.
11. Pietrobon D, Moskowitz MA (2014) Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci* 15(6):379–393.
12. Burstein R, Nosedá R, Borsook D (2015) Migraine: Multiple Processes, Complex Pathophysiology. *J Neurosci* 35(17):6619–6629.

13. Russell MB, Ducros A (2011) Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management. *Lancet Neurol* 10(5):457–470.
14. Ophoff RA, et al. (1996) Familial Hemiplegic Migraine and Episodic Ataxia Type-2 Are Caused by Mutations in the Ca²⁺ Channel Gene CACNL1A4. *Cell* 87(3):543–552.
15. Kors EE, et al. (2001) Delayed cerebral edema and fatal coma after minor head trauma: Role of the CACNA1A calcium channel subunit gene and relationship with familial hemiplegic migraine. *Ann Neurol* 49(6):753–760.
16. Hans M, et al. (1999) Functional Consequences of Mutations in the Human α 1A Calcium Channel Subunit Linked to Familial Hemiplegic Migraine. *J Neurosci* 19(5):1610–1619.
17. Tottene A, et al. (2005) Specific Kinetic Alterations of Human CaV2.1 Calcium Channels Produced by Mutation S218L Causing Familial Hemiplegic Migraine and Delayed Cerebral Edema and Coma after Minor Head Trauma. *J Biol Chem* 280(18):17678–17686.
18. Tottene A, et al. (2009) Enhanced Excitatory Transmission at Cortical Synapses as the Basis for Facilitated Spreading Depression in CaV2.1 Knockin Migraine Mice. *Neuron* 61(5):762–773.
19. Eikermann-Haerter K, et al. (2009) Genetic and hormonal factors modulate spreading depression and transient hemiparesis in mouse models of familial hemiplegic migraine type 1. *J Clin Invest* 119(1):99–109.
20. Chanda M, et al. (2013) Behavioral evidence for photophobia and stress-related ipsilateral head pain in transgenic *Cacna1a* mutant mice. *Pain* 154(8):1254–1262.
21. Ferrari MD, Klever RR, Terwindt GM, Ayata C, van den Maagdenberg AMJM (2015) Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. *Lancet Neurol* 14(1):65–80.
22. Thomsen LL, et al. (2007) The genetic spectrum of a population-based sample of familial hemiplegic migraine. *Brain* 130(2):346–356.
23. Jurkat-Rott K, et al. (2004) Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants. *Neurology* 62(10):1857–1861.
24. Molecular Background of Leak K⁺ Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels | Physiological Reviews Available at: https://www.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00029.2009?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed [Accessed April 1, 2019].
25. Lafrenière RG, et al. (2010) A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med* 16(10):1157–1160.
26. Coppola G, Crémers J, Gérard P, Pierelli F, Schoenen J (2011) Effects of light deprivation on visual evoked potentials in migraine without aura. *BMC Neurol* 11(1):91.
27. Vecchia D, Pietrobon D (2012) Migraine: a disorder of brain excitatory–inhibitory balance? *Trends Neurosci* 35(8):507–520.

28. Rogawski MA (2012) Migraine and Epilepsy—Shared Mechanisms within the Family of Episodic Disorders. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, eds Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV (National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD)). 4th Ed. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98193/> [Accessed April 1, 2019].
29. Leao AAP (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7(6):359–390.
30. Dreier JP, Reiffurth C (2015) The Stroke-Migraine Depolarization Continuum. *Neuron* 86(4):902–922.
31. Torrente D, et al. (2014) Increased calcium influx triggers and accelerates cortical spreading depression in vivo in male adult rats. *Neurosci Lett* 558:87–90.
32. Nedergaard M, Hansen AJ (1988) Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res* 449(1):395–398.
33. Lauritzen M, Hansen AJ (1992) The Effect of Glutamate Receptor Blockade on Anoxic Depolarization and Cortical Spreading Depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 12(2):223–229.
34. Footitt DR, Newberry NR (1998) Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro. *Brain Res* 781(1):339–342.
35. Jing J, Aitken PG, Somjen GG (1993) Role of calcium channels in spreading depression in rat hippocampal slices. *Brain Res* 604(1):251–259.
36. Ayata C, Shimizu-Sasamata M, Lo EH, Noebels JL, Moskowitz MA (1999) Impaired neurotransmitter release and elevated threshold for cortical spreading depression in mice with mutations in the $\alpha 1A$ subunit of P/Q type calcium channels. *Neuroscience* 95(3):639–645.
37. van den Maagdenberg AMJM, et al. (2004) A *Cacna1a* Knockin Migraine Mouse Model with Increased Susceptibility to Cortical Spreading Depression. *Neuron* 41(5):701–710.
38. Tottene A, Urbani A, Pietrobon D (2011) Role of different voltage-gated Ca^{2+} channels in cortical spreading depression: specific requirement of P/Q-type Ca^{2+} channels. *Channels Austin Tex* 5(2):110–114.
39. Capuani C, et al. (2016) Defective glutamate and K^{+} clearance by cortical astrocytes in familial hemiplegic migraine type 2. *EMBO Mol Med* 8(8):967–986.
40. Tfelt-Hansen PC History of migraine with aura and cortical spreading depression from 1941 and onwards. *Cephalalgia* 0(0). doi:10.1111/j.1468-2982.2009.02015.x.
41. Cao Y, Welch KMA, Aurora S, Vikingstad EM (1999) Functional MRI-BOLD of Visually Triggered Headache in Patients With Migraine. *Arch Neurol* 56(5):548–554.
42. Hadjikhani N, et al. (2001) Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci* 98(8):4687–4692.

43. Young WB, Siow HC, Silberstein SD (2004) Anticonvulsants in migraine. *Curr Pain Headache Rep* 8(3):244–250.
44. Bolay H, et al. (2002) Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 8(2):136–142.
45. Buzzi MG, Moskowitz MA (2005) The pathophysiology of migraine: year 2005. *J Headache Pain* 6(3):105.
46. Escayg A, et al. (2000) Mutations of *SCN1A*, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* 24(4):343–345.
47. Claes L, et al. (2001) De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene *SCN1A* Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Am J Hum Genet* 68(6):1327–1332.
48. Lossin C, et al. (2003) Epilepsy-associated dysfunction in the voltage-gated neuronal sodium channel *SCN1A*. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23(36):11289–11295.
49. Frontiers | Gain of Function for the *SCN1A/hNav1.1-L1670W* Mutation Responsible for Familial Hemiplegic Migraine | Frontiers in Molecular Neuroscience Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00232/full> [Accessed April 1, 2019].
50. Ellender TJ, Raimondo JV, Irkle A, Lamsa KP, Akerman CJ (2014) Excitatory Effects of Parvalbumin-Expressing Interneurons Maintain Hippocampal Epileptiform Activity via Synchronous Afterdischarges. *J Neurosci* 34(46):15208–15222.
51. Yekhlief L, Breschi GL, Lagostena L, Russo G, Taverna S (2014) Selective activation of parvalbumin- or somatostatin-expressing interneurons triggers epileptic seizurelike activity in mouse medial entorhinal cortex. *J Neurophysiol* 113(5):1616–1630.
52. Schlingloff D, Káli S, Freund TF, Hájos N, Gulyás AI (2014) Mechanisms of Sharp Wave Initiation and Ripple Generation. *J Neurosci* 34(34):11385–11398.
53. Cestèle S, Catterall WA (2000) Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82(9):883–892.
54. Escoubas P, Diochot S, Célérier M-L, Nakajima T, Lazdunski M (2002) Novel Tarantula Toxins for Subtypes of Voltage-Dependent Potassium Channels in the Kv2 and Kv4 Subfamilies. *Mol Pharmacol* 62(1):48–57.
55. Osteen JD, et al. (2016) Selective spider toxins reveal a role for the $Na_v1.1$ channel in mechanical pain. *Nature* 534(7608):494–499.
56. Richards KL, et al. (2018) Selective $Na_v1.1$ activation rescues Dravet syndrome mice from seizures and premature death. *Proc Natl Acad Sci* 115(34):E8077–E8085.
57. Zhang F, et al. (2011) The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools. *Cell* 147(7):1446–1457.

58. Optogenetic induction of cortical spreading depression in anesthetized and freely behaving mice - Thijs Houben, Inge CM Loonen, Serapio M Baca, Maarten Schenke, Johanna H Meijer, Michel D Ferrari, Gisela M Terwindt, Rob A Voskuyl, Andrew Charles, Arn MJM van den Maagdenberg, Else A Tolner, 2017 Available at: https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0271678X16645113?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&journalCode=jcba [Accessed April 1, 2019].
59. Chung DY, et al. (2019) Determinants of Optogenetic Cortical Spreading Depolarizations. *Cereb Cortex* 29(3):1150–1161.
60. Royal P, et al. (2019) Migraine-Associated TRESK Mutations Increase Neuronal Excitability through Alternative Translation Initiation and Inhibition of TREK. *Neuron* 101(2):232-245.e6.
61. Guyon A, et al. (2009) Glucose Inhibition Persists in Hypothalamic Neurons Lacking Tandem-Pore K⁺ Channels. *J Neurosci* 29(8):2528–2533.
62. Yu G, Zerucha T, Ekker M, Rubenstein JLR (2001) Evidence that GRIP, a PDZ-domain protein which is expressed in the embryonic forebrain, co-activates transcription with DLX homeodomain proteins. *Dev Brain Res* 130(2):217–230.
63. Vinogradova LV (2018) Initiation of spreading depression by synaptic and network hyperactivity: Insights into trigger mechanisms of migraine aura. *Cephalalgia* 38(6):1177–1187.
64. Functional Analysis of a Migraine-Associated TRESK K⁺ Channel Mutation | Journal of Neuroscience Available at: <http://www.jneurosci.org/content/33/31/12810.long> [Accessed April 1, 2019].
65. Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M (2000) Human TREK2, a 2P Domain Mechanosensitive K⁺ Channel with Multiple Regulations by Polyunsaturated Fatty Acids, Lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem* 275(37):28398–28405.
66. Hervieu GJ, et al. (2001) Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience* 103(4):899–919.
67. Yoo S, et al. (2009) Regional expression of the anesthetic-activated potassium channel TRESK in the rat nervous system. *Neurosci Lett* 465(1):79–84.
68. Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain J Neurol* 117 (Pt 1):199–210.
69. Guo Z, Cao Y-Q (2014) Over-Expression of TRESK K⁺ Channels Reduces the Excitability of Trigeminal Ganglion Nociceptors. *PLOS ONE* 9(1):e87029.
70. Costa C, et al. (2013) Cortical spreading depression as a target for anti-migraine agents. *J Headache Pain* 14(1):62.