

Université de Montréal

Impact d'un épisode asphyxique périnatal associé à des convulsions sur le développement des interneurons corticaux : rôle de l'*adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK)

Par

Dominique Dufour Bergeron

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en sciences biomédicales,

Option générale

Août, 2013 dépôt de l'ouvrage

Dominique Dufour Bergeron, 2013 ©

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Impact d'un épisode asphyxique périnatal associé à des convulsions sur le développement des interneurons corticaux : rôle de l'*adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK)

Présenté par :

Dominique Dufour Bergeron

Président rapporteur : Dr Alexander Parker Jodey

Directeur de recherche : Dre Graziella Di Cristo

Membre du jury : Dre Zoha Kibar

Résumé en français

L'encéphalopathie hypoxique-ischémique cause des milliers de victimes à travers le monde chaque année. Les enfants survivants à un épisode hypoxique-ischémique sont à risque de développer des problèmes neurologiques incapacitants comme une paralysie cérébrale, un retard mental, une épilepsie ou des troubles d'ordre comportemental. Les modèles animaux ont amélioré nos connaissances sur les mécanismes sous-jacents aux dommages cérébraux, mais elles sont encore trop incomplètes pour être capables de prévenir les problèmes neurologiques. Ce projet vise à comprendre l'impact d'un épisode asphyxique périnatale associé à des convulsions ainsi que l'activation de l'*adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK) sur les circuits GABAergiques inhibiteurs en développement chez la souris.

Dans le but d'investiguer le sort des neurones inhibiteurs, appelés interneurones, suite à un épisode asphyxique périnatal associé à des convulsions avec des animaux transgéniques, nous avons pris avantage d'un nouveau modèle d'hypoxie permettant d'induire des convulsions chez la souris. Deux populations d'interneurones représentant ensemble environ 60% de tous les interneurones corticaux ont été étudiées, soit les cellules exprimant la parvalbumine (PV) et les cellules exprimant la somatostatine (SOM). L'étude stéréologique n'a montré aucune mort neuronale de ces deux populations d'interneurones dans l'hippocampe chez les souris hypoxique d'âge adulte. Par contre, le cortex des souris hypoxiques présentait des zones complètement ou fortement dépourvues de cellules PV alors que les cellules SOM n'étaient pas affectées. L'utilisation d'une lignée de souris transgénique exprimant une protéine verte fluorescente (GFP) dans les cellules PV nous a permis de comprendre que les trous PV sont le reflet de deux choses : 1) une diminution des cellules PV et 2) une immaturité des cellules PV restantes.

Puisque les cellules PV sont spécifiquement affectées dans la première partie de notre étude, nous avons voulu étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette vulnérabilité. L'AMPK est un senseur d'énergie qui orchestre le rétablissement des

niveaux d'énergie cellulaire dans le cas d'une déplétion énergétique en modulant des voies de signalisation impliquant la synthèse de protéines et l'excitabilité membranaire. Il est possible que l'activation d'AMPK suite à un épisode asphyxique périnatal associé à des convulsions soit néfaste à long-terme pour le circuit GABAergique en développement et modifie l'établissement de l'innervation périsomatique d'une cellule PV sur les cellules pyramidales. Nous avons étudié cette hypothèse dans un modèle de culture organotypique en surexprimant la forme *wild-type* (WT) de la sous-unité $\alpha 2$ d'AMPK, ainsi qu'une forme mutée dominante négative (DN), dans des cellules PV individuelles. Nous avons montré que pendant la phase de formation synaptique (jours post-nataux équivalents EP 10-18), la surexpression de la forme WT désorganise la stabilisation des synapses. De plus, l'abolition de l'activité d'AMPK semble augmenter le nombre de synapses périsomatiques faits par la cellule PV sur les cellules pyramidales pendant la phase de formation et semble avoir l'effet inverse pendant la phase de maturation (EP 16-24).

La neurotransmission GABAergique joue plusieurs rôles dans le cerveau, depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte des interneurones, et une dysfonction des interneurones a été associée à plusieurs troubles neurologiques, comme la schizophrénie, l'autisme et l'épilepsie. La maturation des circuits GABAergiques se fait majoritairement pendant la période post-natale et est hautement dépendante de l'activité neuronale et de l'expérience sensorielle. Nos résultats révèlent que le lourd fardeau en demande énergétique d'un épisode asphyxique périnatal peut causer une mort neuronale sélective des cellules PV et compromettre l'intégrité de leur maturation. Un des mécanismes sous-jacents possible à cette immaturité des cellules PV suite à l'épisode hypoxique est l'activation d'AMPK, en désorganisant leur profil d'innervation sur les cellules pyramidales. Nous pensons que ces changements dans le réseau GABAergique pourrait contribuer aux problèmes neurologiques associés à une insulte hypoxique.

Mots clés

Asphyxie périnatale, Interneurones, Développement, AMPK, Culture organotypique

English summary

Hypoxia-ischemia encephalopathy causes thousands of victims each year around the world. Children surviving such hypoxia-ischemia insults are at risk of developing disabling neurological problems such as cerebral palsy, epilepsy or cognitive problems. Animal models have improved our knowledge about the underlying mechanisms causing cerebral injury, but it is still too incomplete to be able to prevent neurological problems. This project aims to understand the impact of a perinatal asphyxic insult associated with seizures as well as the activation of *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK) on developing inhibitory GABAergic networks in mouse.

With the objective to study the fate of inhibitory cells, called interneurons, following a perinatal asphyxia insult associated with seizures in transgenic animals, we took advantage of a new hypoxia model allowing us to induce seizures in mice. Cells expressing parvalbumin (PV) and cells expressing somatostatin (SOM) were studied as together they represent about 60% of all cortical interneurons. A stereological study showed no cell death within those two interneuron populations in the hippocampus of adult hypoxic mice. However, the cortex of hypoxic mice showed zones with complete or strongly lacking PV cells, whereas SOM cells were not affected. A transgenic mouse line allowed us to show that PV holes are the reflection of two things 1) a decrease in PV cells and 2) immaturity of surviving PV cells.

Because PV cells are selectively affected in the first part of our study, we wanted to study the molecular mechanisms underlying this vulnerability. AMPK is a metabolic energy sensor that orchestrates the recovery of energy in cells undergoing energy depletion by modulating cellular pathways involved in protein synthesis and membrane excitability. It is possible that the activation of AMPK following a perinatal asphyxic insult associated with seizures is detrimental for developing GABAergic networks and modifies the establishment of perisomatic innervation of PV cells on excitatory pyramidal cells. We have studied this hypothesis in an organotypic system by overexpressing the wild-type (WT) form and the dominant negative (DN) form of AMPK

$\alpha 2$ sub-unit in individual PV cells. We have observed that during the synaptic formation phase (equivalent post-natal day EP 10-18), overexpressing WT AMPK disorganises synapse stabilisation. Moreover, abolishing AMPK activity with the transfection of AMPK DN seems to increase the number of perisomatic synapses made by PV cells onto pyramidal cells, and seems to have the inverse effect during the synaptic maturation phase (EP 18-24).

GABAergic neurotransmission plays many roles in the brain, from interneurons birth to adulthood, and a dysfunction in GABAergic neurotransmission has been associated with many neurological diseases such as schizophrenia, autism and epilepsy. GABAergic networks maturation mainly happens postnatally and is highly dependent on neural activity and sensory experience. Our results reveal that the heavy energetic burden caused by an asphyxic insult can cause selective PV cells death and interfere with their maturation. AMPK activation following an asphyxic insult could be one mechanism interfering with PV cells maturity by disorganising their pattern of innervation onto pyramidal cells. We think that these GABAergic networks alterations could contribute to the neurological problems associated to a hypoxic insult.

Key words

Perinatal asphyxia, Interneurons, Development, AMPK, Organotypic culture

Table des matières

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	I
MOTS CLÉS	III
ENGLISH SUMMARY	IV
KEY WORDS	VI
Liste des figures, images et tables	IX
Liste des abréviations	XI
1. INTRODUCTION	1
1.1 ASPHYXIE PÉRinataLE CHEZ L'HUMAIN	1
1.1.1 CONSÉQUENCES À LONG-TERME	2
1.1.2 DOMMAGES HYPOXIQUES-ISCHÉMIQUES	3
1.1.3 MODÈLES ANIMAUX	4
1.2 VULNÉRABILITÉ DU CERVEAU IMMATURE	6
1.2.1 MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE	6
1.2.2 CONVULSIONS	7
1.3 LES CIRCUITS GABAÉRGIQUES CORTICAUX	8
1.3.1 FONCTIONS DES INTERNEURONES CORTICAUX	9
1.3.2 LES TYPES D'INTERNEURONES CORTICAUX	11
1.3.4 DÉVELOPPEMENT DES INTERNEURONES CORTICAUX	12
1.3.5 DYSFONCTIONS DES INTERNEURONES CORTICAUX	15
1.4 ADENOSINE MONOPHOSPHATE-ACTIVATED PROTEIN KINASE (AMPK)	17
1.4.1 CIBLES NEURONALES D'AMPK	19
1.4.2 RÔLE D'AMPK EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE ET PATHOPHYSIOLOGIQUE	21
1.4.3 RÔLE D'AMPK DANS LE DÉVELOPPEMENT NEURONAL	22
1.5 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	23
2. ÉTUDE DE L'IMPACT D'UNE INSULTE ASPHYXIQUE PÉRinataLE ASSOCIÉE À DES CONVULSIONS SUR LE DÉVELOPPEMENT DES INTERNEURONES CORTICAUX	25
2.1 MÉTHODOLOGIE	25
2.1.1 MODÈLE	25
2.1.2 PRÉPARATION DES ANIMAUX ET DES TISSUS	27

2.1.3	ANALYSE DES RÉSULTATS	30
2.2	RÉSULTATS	34
2.3	DISCUSSION	43
3.	ÉTUDE DU RÔLE D'AMPK SUR LE DÉVELOPPEMENT DES INTERNEURONES CORTICAUX	46
3.1	MÉTHODOLOGIE	46
3.1.1	CLONAGE	46
3.1.2	PRÉPARATION DES CULTURES	47
3.1.3	ANALYSE DES RÉSULTATS	48
3.2	RÉSULTATS	51
3.3	DISCUSSION	57
4.	CONCLUSION	60
5.	BIBLIOGRAPHIE	61

Liste des figures, images et tables

Figures

Figure 1.	Exemples d'enregistrements EEG et résumé des convulsions et des myoclonies pour chaque animaux	26
Figure 2.	Reconstitution d'une section de cortex immunomarcuée contre PV provenant d'une souris HYP.....	37
Figure 3.	Estimation du nombre de cellules SOM dans le cortex.....	38
Figure 4.	Estimation du nombre des cellules SOM et PV dans l'hippocampe.	39
Figure 5.	Estimation de l'apoptose dans le cortex après hypoxie.....	40
Figure 6.	Reconstitution de sections de cortex provenant d'une souris G42 CTRL et d'une souris G42 HYP.....	41
Figure 7.	Immunomarcage contre PV et Kv3.1b de cortex de souris G42 CTRL et HYP.....	42
Figure 8.	Évaluation de l'activation de la voie mTOR après surexpression de la forme WT et DN de AMPK en culture organotypique.....	54
Figure 9.	Densité de boutons périssomatiques après surexpression de la forme WT et DN de AMPK en culture organotypique.....	55
Figure 10.	Surexpression d'AMPK WT dans une cellule PV à EP 10-18 en culture organotypique.....	56

Tables

Table 1.	Résumé des types d'interneurones basé sur les marqueurs neurochimiques.....	12
Table 2.	Paramètres utilisés pour l'étude stéréologique.....	31

Images

Image 1.	Profils de connectivité synaptique entre pyramidales et interneurons priment dans le cortex.....	10
Image 2.	Routes empruntées par les interneurons immatures lors de leur migration vers le cortex.....	13
Image 3.	Activation de AMPK.....	18
Image 4.	Photographie et schéma de la chambre hypoxique.....	26
Image 5.	Représentation schématique de la méthode de stéréologie par dissecteur optique.....	30
Image 6.	Schéma des plasmides utilisés dans l'étude.....	46

Liste des abbréviations

5HT3aR: récepteur sérotoninergique 5HT3a

ADP: adénosine diphosphate

AMP: adénosine monophosphate

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate

AMPK : *adenosine monophosphate-activated protein kinase*

ANOVA: analyse de variance

ATP: adénosine triphosphate

BSNP: décharge de type *burst* non-pyramidal

CA1: corne d'Ammon 1

CA3: corne d'Ammon 3

CTRL: contrôle

DN: dominant négatif

E: jour embryonique

EEG: électroencéphalogramme

EHI: encéphalopathie hypoxique-ischémique

eIF4E: facteur d'initiation de la translation eukaryotique 4E

EN: encéphalopathie néonatale

EP: jour équivalent post-natal

FS: décharge rapide (*fast-spiking*)

GABA: acide γ -aminobutyric

GAD65: glutamate décarboxylase 65

GAD67: glutamate décarboxylase 67

GFP: protéine verte fluorescente

GIRKs: canaux à rectification du courant entrant potassique couplés aux protéines G

h: heures

HYP: hypoxique

Hz: hertz

KCC2: potassium chloride cotransporter 2

LGE: éminence latérale ganglionique

MGE: éminence médiale ganglionique
mTOR: *mammalian target of rapamycin*
NCx: Néocortex
NMDA: acide N-méthyl-D-aspartique
P: jour post-natal
pS6: protéine S6 phosphorylée
PV: parvalbumine
ROS: espèce réactive d'oxygène
RSNP: décharge régulière non-pyramidale
S6K: S6 kinase
SOM: somatostatine
SVZ: zone subventriculaire
TSC1: tuberous sclerosis protein 1
V1: visuel primaire
VIP: peptide intestinal vasoactif
WT: wild-type

1. Introduction

1.1 Asphyxie périnatale chez l'humain

L'asphyxie périnatale (aussi appelée asphyxia neonatorum ou hypoxie à la naissance) est un terme large défini comme un échange de gaz respiratoires diminué entre la mère et le fœtus menant à une réduction du pH (acidose métabolique)¹. Bien que le terme asphyxie périnatale soit juste, il est plutôt utilisé en situation expérimentale où l'on peut en contrôler les paramètres. Dans un contexte clinique, on utilise généralement épisode hypoxique-ischémique périnatal pour décrire cette condition causée par un apport sanguin ombilical ou utérin insuffisant². Le diagnostic clinique de l'épisode hypoxique-ischémique néonatal se base sur plusieurs critères dus à l'impossibilité de constater l'évènement perturbateur³. Ces critères définissant un épisode hypoxique périnatal sont: (a) Une évidence d'acidose métabolique (pH < 7.00); (b) la présence immédiate d'une encéphalopathie néonatale (EN) modérée ou sévère; (c) l'exclusion d'une étiologie autre qu'hypoxique^{4,5}.

L'EN est un dérèglement de plusieurs signes neurologiques définis durant les 7 premiers jours de vie. Chez le nouveau-né souffrant d'EN modérée à sévère, on remarque une respiration difficile, une hypotonie, des convulsions ainsi qu'une diminution des réflexes et du niveau de conscience. Il existe plusieurs causes possible à l'EN dont un désordre métabolique, une infection, un accident vasculaire cérébral ou l'exposition à des drogues. Si la cause de L'EN est un épisode asphyxique, on dit alors que c'est une encéphalopathie hypoxique-ischémique (EHI). La proportion d'EN d'origine hypoxique-ischémique est estimée à 30% dans les pays développés¹. Quelques-uns des évènements catastrophiques hypoxiques pouvant dégénérer en encéphalopathie sont par exemple, une rupture utérine, un prolapsus du cordon ombilical, une embolie du fluide amniotique ou une rupture placentaire⁶. Il arrive fréquemment que des symptômes chez le nouveau-

né se présentent comme un épisode hypoxique-ischémique, bien qu'aucun évènement catastrophique n'ait été identifié. D'autres facteurs de risques de l'EHI sont reliés à un âge maternel de moins de 16 ans ou plus de 40 ans, un statut socio-économique bas, une maladie maternelle telle l'hypertension ou le diabète et le manque de soins prénataux^{1,7}. Une méta-analyse montre que l'incidence de l'EHI est entre 1.3 et 1.7 cas sur 1000 enfants nés à terme vivant¹. L'utilisation de différentes définitions de l'EHI par les cliniciens et les investigateurs crée une littérature hétérogène sur le sujet et rend la comparaison des études laborieuse¹.

Dû à la grande difficulté de prévenir les épisodes hypoxique-ischémiques, les traitements de l'EHI se limitent à des interventions de soutien pour maintenir l'homéostasie physiologique du nouveau-né et contrôler les lésions cérébrales⁷.

1.1.1 Conséquences à long-terme

Les conséquences de l'EN dépendent de sa gravité. Un enfant ayant subi une EN légère a 97 à 100% des chances de se développer normalement alors qu'un enfant ayant subi une EN modérée risque de présenter des séquelles dans 20 à 35% des cas. Les séquelles sont principalement d'ordre comportemental et incluent l'hyperactivité, des problèmes de socialisation avec les pairs, des comportements dépressifs, des troubles de l'attention et d'anxiété^{8,9}. Finalement, une grande proportion des enfants ayant subi une EN sévère meurt, alors que les survivants développent des problèmes neurologiques incapacitants comme une paralysie cérébrale, un retard mental ou une épilepsie. Les symptômes associés à la paralysie cérébrale ne seront pas traités dans ce mémoire. Il est également intéressant de souligner que plusieurs études ont montré que l'asphyxie périnatale est un facteur de risque pour la schizophrénie^{10,11}.

1.1.2 Dommages hypoxiques-ischémiques

Profils des lésions cérébrales

Les études post-mortem sur les cerveaux de nouveau-nés nés à terme ayant subi un épisode hypoxique-ischémique montrent que le profil de lésion la plus commune est une nécrose neuronale sélective dans les aires cérébrales associées avec une grande demande énergétique. Chez les enfants atteints d'une EHI, des dommages au thalamus et aux noyaux gris centraux sont présents dans 35 à 85% des cas. Des dommages au tronc cérébral sont présents dans 15 à 20% des cas et peuvent dégénérer en *status marmoratus*, dont les caractéristiques sont la mort neuronale, la gliose et l'hypermyélination. Il existe également des profils de dommages nécrotiques plus diffus, touchant à la fois l'hippocampe, le thalamus, les noyaux gris centraux, le tronc cérébral, le cervelet et la corne antérieure de la moelle épinière^{10,12}.

Mécanismes des dommages cérébraux

Les modèles animaux d'hypoxie-ischémie ont permis d'en connaître un peu plus sur les mécanismes pathophysiologiques menant aux dommages cérébraux. Ces dommages se produisent en différentes phases. Pendant la première phase, soit l'épisode hypoxique-ischémique, la déplétion d'énergie cellulaire perturbe les gradients membranaires menant à une relâche excessive de glutamate dans les fentes synaptiques. La surstimulation des récepteurs glutaminergiques induit un influx de calcium toxique dans la cellule. Ce mécanisme est appelé excitotoxicité et crée des dommages cellulaires importants pouvant mener à la mort par nécrose. Une deuxième vague de dommages cellulaires arrive pendant la phase de reperfusion, lorsque le débit sanguin revient à la normale suite à l'épisode hypoxique-ischémique, et semble causé par les espèces réactives d'oxygène (ROS). Les ROS mènent à une activation des cascades apoptotiques

par perturbation de la membrane mitochondriale et la relâche de cytochrome C qui s'ensuit. La dernière phase est la phase apoptotique secondaire ou retardée, puisqu'elle arrive plusieurs heures après l'épisode hypoxique-ischémique et dure pendant quelques jours. Les mécanismes menant à cette mort cellulaire sont encore mal compris^{12,13}.

1.1.3 Modèles animaux

Il est possible de classifier les modèles animaux d'EHI en trois catégories, soit les modèles hypoxiques (asphyxie de l'animal ou de la mère), les modèles ischémiques (diminution planifiée du flux sanguin vers le cerveau) et les modèles hypoxiques-ischémiques (combinaison des deux). Le type et la sévérité des lésions sont donc très différents selon le type modèle, mais il existe aussi des différences intra-modèles puisque les protocoles diffèrent sur plusieurs points dont la longueur, la sévérité, le moment et la méthode d'induction de l'asphyxie. Il n'y a pas de consensus sur le protocole qui représente le mieux la pathologie vue son large spectre de causes, de tests diagnostiques et de manifestations à court et long terme¹⁴.

La sévérité de l'épisode hypoxique-ischémique influence grandement le profil des dommages cérébraux¹². Le modèle animal d'EHI le plus utilisé est celui développé par Rice et al. en 1981 et consiste en une ligature unilatérale de l'artère carotide suivie d'une hypoxie d'une durée de 3 heures 30 minutes chez des rats P7. Cette technique provoque un infarctus dans plus de 50% des cas et des dommages neuronaux modérés à sévères dans 90% des cas¹⁵. Les modèles animaux sans ligature de la carotide provoquent rarement des dommages cérébraux comme ceux mentionnés dans la section « dommages hypoxiques-ischémiques »¹⁶. De plus, il semble qu'un épisode hypoxique-ischémique d'une durée de 15 minutes induit des dommages d'origine apoptotique, alors qu'une insulte d'une durée de 60 minutes induit des dommages d'origine nécrotique¹³.

Le moment d'induction de l'épisode hypoxique-ischémique est des plus important puisqu'il existe des mécanismes spécifiques à certaines périodes du développement qui sous-tendent la vulnérabilité du cerveau à l'asphyxie (voir prochaine section « vulnérabilité du cerveau immature »)¹⁶. L'extrapolation de l'âge animal en âge humain n'est pas une science exacte et chaque investigateur en va de sa propre opinion. Dans le cas d'une insulte intrapartum, la question devient complexe puisqu'à leur naissance, le cerveau des rongeurs n'est pas aussi développé que celui de l'humain et n'a donc pas la même susceptibilité à un épisode hypoxique. Pour contrer ce problème, il est possible d'utiliser d'autres espèces animales que les rongeurs, les primates non-humains par exemple, qui sont plus près de l'homme. L'utilisation de rongeurs étant tout de même plus accessible à la recherche pour des raisons de coût et d'éthique, une grande proportion des modèles d'EHI induit l'épisode asphyxique après la naissance de ceux-ci, généralement entre P7 et P12¹⁴. Cet intervalle de temps semble concorder avec la période de vulnérabilité chez l'humain car, chez les rongeurs, l'asphyxie induit des convulsions à cet âge seulement, contrairement à une induction précoce ou retardée, augmente la susceptibilité de l'animal à développer des convulsions spontanées à l'âge adulte, augmente la vulnérabilité aux agents convulsivants et provoque des troubles du comportement et des déficits cognitifs à long-terme¹⁷.

Le modèle utilisé pour notre étude est un modèle d'asphyxie périnatale associée à des convulsions chez la souris développé par *Chattopadyaya* (en cours de publication). La durée de l'hypoxie est courte et l'ischémie n'est pas provoquée. Le grand avantage d'un modèle d'asphyxie périnatale chez la souris est la possibilité d'utilisation de lignées transgéniques. Le modèle de *Chattopadyaya* réplique la vulnérabilité du cerveau immature aux convulsions à P8-P9, ainsi que l'augmentation à long-terme de la susceptibilité aux convulsions spontanées. Ce modèle est détaillé dans la section « méthodes ».

1.2 Vulnérabilité du cerveau immature

1.2.1 Métabolisme énergétique

Dans les premières semaines post-natales, la demande énergétique cérébrale, ainsi que les niveaux du transporteur de glucose neuronal, GLUT3, augmentent proportionnellement avec l'activité synaptique et la maturation neuronale chez le rat. L'utilisation du glucose cérébral est d'environ 10% de la valeur chez l'adulte dans les deux premières semaines de vie. Le cerveau immature, comparativement au cerveau adulte, a la capacité d'utiliser des substrats énergétiques autre que le glucose et les corps cétoniques contribuent à environ 60% de l'énergie cérébrale. L'incapacité de transporter efficacement le glucose à travers la barrière hémato-encéphalique pendant la période post-natale rend le cerveau immature vulnérable aux épisodes hypoxiques ou hypoxique-ischémiques car le carburant énergétique pendant l'asphyxie provient de la glycolyse anaérobie*. Chez le nouveau-né, le glucose disponible est donc rapidement utilisé et les possibilités de renouveler les stocks sont grandement limitées. Il n'est donc pas étonnant que chez les nouveau-nés ayant subi une insulte hypoxique-ischémique, les lésions se trouvent communément dans les aires cérébrales associées avec une grande demande énergétique et que l'étendue des dommages concorde avec la durée et la sévérité de l'épisode asphyxique¹⁶.

*La glycolyse anaérobie est la première phase du processus de la glycolyse. Elle permet de produire 2 molécules d'ATP à partir de la transformation d'une molécule de glucose en pyruvate. En condition aérobie, le pyruvate sera transformé en H₂O et en CO₂ par le cycle de Krebs et permettra la production de 38 molécules d'ATP grâce à la chaîne respiratoire. En condition anaérobie, le pyruvate est transformé en lactate sans passer par le cycle de Krebs.

1.2.2 Convulsions

Le cerveau immature est plus susceptible aux convulsions que le cerveau adulte. En effet, l'incidence de convulsion est la plus haute durant la période néonatale. Plusieurs causes moléculaires ont été étudiées dans des modèles animaux pouvant expliquer cette susceptibilité. D'une part, le système GABAergique du nouveau-né serait dépolarisant ou moins inhibiteur que chez l'adulte. Cela est dû à une expression tardive du cotransporteur de chlore KCC2 qui sert à pomper le chlore hors du neurone. En son absence, le neurone se retrouve avec un gradient de chlore plus grand chez le nouveau-né et l'ouverture des canaux chlore GABA_A fait sortir le chlore chargé négativement rendant le neurone plus près de son seuil de potentiel d'activation¹⁸. Le système glutaminergique serait également impliqué dans la susceptibilité du jeune cerveau aux convulsions car les récepteurs glutaminergiques AMPA et NMDA matures plus rapidement que le système GABAergique, rendant la balance d'excitation et d'inhibition précaire. De plus, certaines différences dans les sous-unités des récepteurs glutaminergiques accroissent l'excitabilité pendant la période postnatale. Par exemple, une augmentation du ratio NR2B/NR2A prolonge les potentiels d'action excitateurs. L'hyperexcitabilité des circuits neuronaux dans le cerveau immature pourrait expliquer pourquoi les convulsions néonatales sont souvent réfractaires aux agents pharmacologiques qui potentialisent la transmission GABAergique. Ces agents pourraient même être dommageables dans un cerveau immature¹⁹.

Un paradoxe existe du fait que le cerveau immature bien que plus susceptible aux convulsions que le cerveau adulte, est également moins susceptible d'encourir des dommages neuronaux reliés à ces convulsions. Les convulsions néonatales comme celles que l'on retrouve chez les nouveau-nés souffrant d'EHI sont tout de même potentiellement dangereuses pour le cerveau en développement²⁰. Une étude a montré que des convulsions dans un cerveau immature ne cause pas de dommage neuronal, par contre lorsque les convulsions sont provoquées suite à un épisode hypoxique-

ischémique, les dommages engendrés sont significativement plus graves que l'épisode hypoxique-ischémique seul²¹. Le cerveau en développement, déjà mal adapté pour subvenir à la déplétion énergétique, doit également fournir en énergie les neurones lors des convulsions.

Il est également reconnu que certains types de convulsions augmentent le risque de faire ultérieurement de nouvelles convulsions et de développer des conséquences comportementales néfastes²². Une étude récente sur des rats ayant subi un épisode hypoxique postnatal montre un déploiement anormal des fibres *mossy* dans l'aire CA3 de l'hippocampe à l'âge adulte. Ce phénomène observé dans plusieurs modèles expérimentaux d'épilepsie pourrait contribuer à l'état d'hyperexcitabilité facilitant les convulsions spontanées et les troubles cognitifs à l'âge adulte²³. Les mécanismes moléculaires, cellulaires et de réorganisation des circuits neuronaux sous-jacents à cette susceptibilité dans le cerveau immature sont encore mal compris²².

1.3 Les circuits GABAergiques corticaux

Les neurones peuvent être séparés en deux grandes classes : les excitateurs et les inhibiteurs. Les neurones excitateurs, appelés cellules pyramidales, ou neurones principaux, rassemblent environ 80% de la population neuronale corticale et sont responsables du relais de l'information entre les différentes régions du cerveau. Le principal neurotransmetteur relâché par ces neurones est le glutamate qui a comme cible post-synaptique des récepteurs canaux ligand-dépendant laissant passer des ions chargés positivement produisant un courant exciteur post-synaptique^{24,25}. Les neurones inhibiteurs représentent environ 20% de la population neuronale corticale et sont appelés interneurons, puisque les connections de l'axone sont typiquement faites avec les neurones environnants à l'intérieur d'une même colonne ou entre les colonnes corticales, comparativement aux cellules pyramidales qui peuvent projeter leur axone

dans des régions éloignées du cerveau. Ils sont donc morphologiquement reconnaissables par leur axone extensif près du corps cellulaire, leurs dendrites avec peu ou sans d'épines et leur capacité à former des synapses sur différents sous-domaines du neurone cible. Leur principal neurotransmetteur est l'acide γ -aminobutyrique (GABA) qui, lorsque relâché, se lie au récepteur canal GABA_A post-synaptique laissant entrer du chlore chargé négativement dans le neurone, créant un courant inhibiteur post-synaptique rapide et aux récepteurs GABA_B couplés aux protéines G favorisant une conductance potassique lente. Les chances du neurone d'atteindre le potentiel d'action sont ainsi diminuées²⁵.

1.3.1 Fonctions des interneurones corticaux

Les interneurones sont importants pour moduler la réponse des cellules pyramidales aux signaux excitateurs. Deux profils de connectivité synaptique entre pyramidales et interneurones priment dans le cortex, soit l'inhibition de type *feedback* (image 1A) et l'inhibition de type *feedforward* (image 1B). L'inhibition de type *feedback* est un circuit local en forme de boucle où les cellules pyramidales corticales excitent les interneurones environnants qui vont rétroactivement inhiber ces cellules pyramidales. L'inhibition de type *feedforward* est générée lorsque les pyramidales, et les interneurones locaux inhibant ces pyramidales, sont excités par une afférence provenant d'une autre aire corticale ou d'une région sous-corticale. Que l'excitation provienne de pyramidales environnantes ou éloignées, les interneurones seront donc inévitablement recrutés, rendant l'excitation et l'inhibition des événements indissociables et équilibrés. Tout changement dans le niveau d'excitation, causé par un stimulus sensoriel par exemple, entraîne une réponse automatique du système inhibiteur pour contrebalancer l'excitation du circuit. Les interneurones contrôlent donc précisément la réponse des cellules pyramidales locales aux signaux excitateurs grâce à ces mécanismes d'inhibition de type *feedback* et de type *feedforward*²⁶.

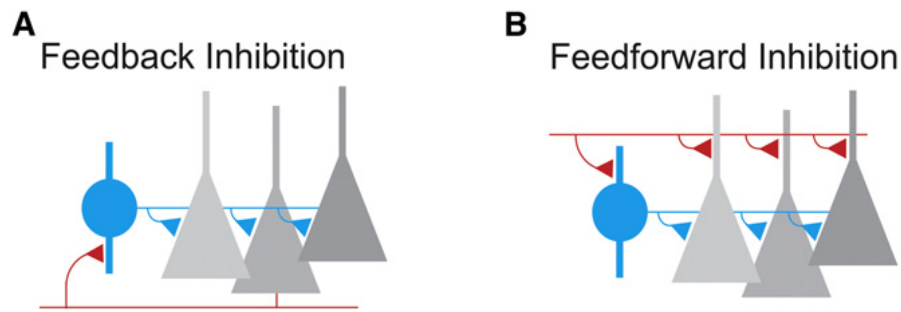


Image 1 : Profils de connectivité synaptique entre pyramidales et interneurons dans le cortex (A) L'inhibition de type feedback est un circuit local en forme de boucle où les cellules pyramidales corticales (gris) excitent les interneurons environnants (bleu) qui vont rétroactivement inhiber ces cellules pyramidales. (B) L'inhibition de type *feedforward* est générée lorsque les pyramidales (gris), et les interneurons locaux (bleu) inhibant ces pyramidales, sont excités par une afférence (rouge) provenant d'une autre aire corticale ou d'une région sous-corticale. Figure modifiée de *Isaacson et Scanziani*²⁶.

Les interneurons semblent également avoir un rôle crucial dans l'organisation de l'activité oscillatoire, telle la synchronisation du rythme de décharge de cellules pyramidales. Dans le cortex, ces rythmes oscillent à différentes fréquences (thêta $\sim 4\text{-}12$ Hz; gamma $\sim 30\text{-}80$ Hz; ultra-rapide ~ 200 Hz) et chacune d'entre elles semble associée à une variété de comportements ou aspects de la cognition. La puissance des oscillations gamma, par exemple, semble corrélée avec la charge de mémoire de travail. Bien que le nombre d'interneurons soit inférieur au nombre de cellules pyramidales, ils ont la capacité de faire des contacts synaptiques avec un grand nombre de cellules pyramidales et de faire plusieurs synapses sur chacune des cellules pyramidales individuelles. Ces propriétés placent les interneurons dans une position idéale pour la synchronisation de l'activité de larges populations de cellules. En déchargeant, les interneurons inhibent momentanément ces larges populations de cellules qui déchargent en synchronie lorsque l'inhibition est levée. Les mécanismes par lesquels les interneurons se synchronisent entre eux sont étudiés par plusieurs modèles théoriques^{26,27}.

1.3.2 Les types d'interneurones corticaux

Les interneurones corticaux sont en fait un groupe hétérogène de cellules en terme d'expression de marqueurs neurochimiques, caractéristiques morphologiques, propriétés électrophysiologiques et par l'emplacement de leurs synapses sur les cibles post-synaptiques²⁸. Au cours des travaux de cette thèse nous avons employé une classification des interneurones basée sur leur propriété neurochimiques pour deux raisons: d'une part il s'agit d'une classification qui permet la visualisation des cellules par immunohistochimie, ou par promoteur spécifique chez les souris transgéniques, et d'autre part, ce critère permet de distinguer deux populations d'interneurones différemment vulnérables chez les patients avec l'épilepsie du lobe temporal (TLE)²². La table 1 montre une classification de grandes classes d'interneurones selon les caractéristiques mentionnées ci-haut. La description qui suit n'est qu'une description partielle des interneurones du cortex et il existe plusieurs autres types d'interneurones et marqueurs d'expression^{28,29}.

Les interneurones exprimant la protéine parvalbulmine liant le calcium (PV) ont généralement un axone qui cible le domaine périsonmatique des cellules pyramidales (dendrites proximales, soma, segment initial de l'axone) et ont la capacité de décharger rapidement et à fréquence élevée. Le domaine périsonmatique, responsable de la sommation des potentiels postsynaptiques arrivant des dendrites, joue donc un rôle important dans la génération d'un potentiel d'action. Les cellules PV ont donc la capacité de contrôler efficacement la réponse de larges populations de cellules pyramidales ainsi que de générer et maintenir les oscillations gamma et thêta. On retrouve dans cette catégorie les cellules à panier (large ou en nid) ciblant le soma ou les dendrites proximales et les cellules chandelier ciblant le segment initial de l'axone. Les cellules de types martinotti sont le plus grand sous-groupe d'interneurones exprimant le neuropeptide somatostatine (SOM) et dont l'axone cible généralement les dendrites distales, permettant un contrôle de l'efficacité et de la plasticité des signaux excitateurs sur les cellules pyramidales. Elles ont une décharge de type régulière. Les autres types d'interneurones exprimant la SOM sont moins bien caractérisés. Le dernier groupe

d'interneurones comprend les cellules exprimant le récepteur sérotoninergique 5HT3a (5HT3aR) et contient un large spectre de sous-groupes avec des caractéristiques diverses^{28,29}.

Table 1 : Résumé des types d'interneurones basé sur les marqueurs neurochimiques.

Marqueurs neurochimiques	% relatif	Caractéristiques morphologiques	Sous-domaine cible des pyramidales	Physiologie Intrinsèque*
Parvalbumine	~ 40%	Cellule à panier	Dendrites proximales/soma	FS/RSNP
		Chandelier	Segment initial de l'axone	FS
Somatostatine	~ 30%	Martinotti	Dendrites distales	RSNP/BSNP
		Autre		
5HT3aR	~ 30%	Bipolaire	Dendrites	
		Double bouquet		
		<i>Bitufted</i>		
		Neuroglialforme		

* Se réfère aux profils de décharges élicités avec des injections intracellulaires de courants dépolarisants; 5HT3aR : Récepteur sérotoninergique ionotropique 5HT3a; FS : décharge rapide; RSNP : décharge régulière non-pyramidale; BSNP : décharge de type éclatement 'burst' non-pyramidale. Adapté de *Rudy et al, 2010*²⁹ et *Wonders et Anderson, 2006*³⁰.

1.3.4 Développement des interneurones corticaux

Naissance et migration

Les cellules PV et SOM naissent dans l'éminence ganglionique médiale, une zone de la région du télencéphale ventral à l'extérieur du néocortex. Leur développement dans cette région est étroitement régulé par les facteurs de transcription Lhx6 et Nkx2.1. Les premiers précurseurs interneuronaux (image 2a) migrent vers le néocortex suivant une route tangentielle superficielle le long de la zone corticale marginale alors que les précurseurs interneuronaux tardifs (image 2b et 2c) empruntent une route tangentielle

plus profonde le long de la zone subventriculaire. Ce chemin est tracé par une série de signaux chimiques attracteurs ou répulsifs. Pendant la migration, la motilité des précurseurs interneuronaux est accrue par des oscillations de calcium intracellulaire spontanées dépendant des canaux calciques de type L. L'activation de ces canaux est dépendante d'une dépolarisation membranaire provoquée par l'activation du récepteur GABA_A et une haute concentration intracellulaire de chlore. Une fois arrivés dans le néocortex, les interneurons intègrent leur couche corticale désignée et terminent leur migration. L'augmentation de l'expression du co-transporteur de chlore KCC2 diminue les niveaux de chlore dans les interneurons et abolit du même coup l'effet dépolarisant du récepteur GABA_A et les oscillations calciques spontanées³¹.

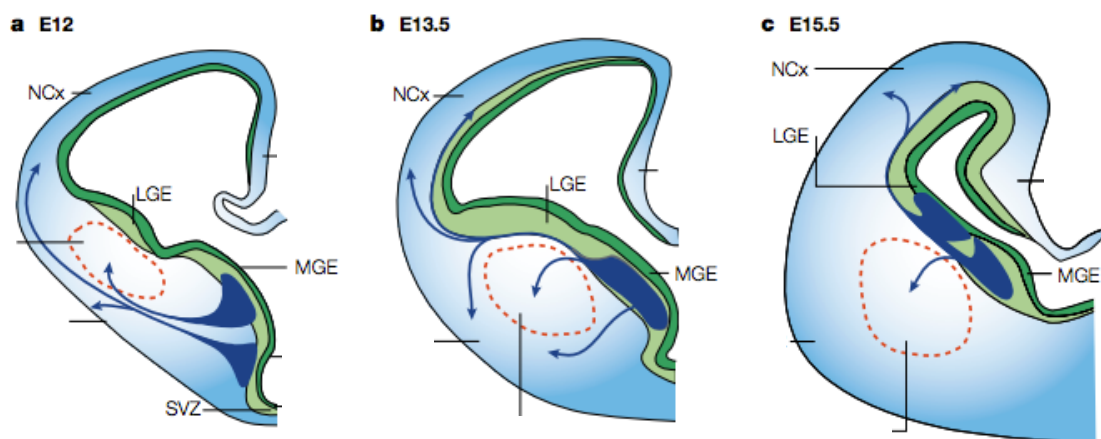


Image 2 : Routes empruntées par les interneurons immature lors de leur migration vers le cortex (lignes bleues). (a) Les premiers précurseurs interneuronaux naissent l'éminence ganglionique médiale (MGE) et migrent vers le néocortex (NCx) suivant une route tangentielle superficielle le long de la zone corticale marginale (b et c) les précurseurs interneuronaux tardifs proviennent du MGE et de l'éminence ganglionique latérale (LGE) et empruntent une route tangentielle plus profonde le long de la zone subventriculaire (SVZ). Modifié à partir de *Marin et Rubenstein, 2001*³¹.

Maturation des synapses inhibitrices

La morphologie de l'arborisation axonale ainsi que la capacité des interneurones à cibler sélectivement un domaine cellulaire pot-synaptique sont des caractéristiques génétiquement déterminées. La capacité de former des synapses est également intrinsèque aux interneurones, bien que le nombre de celles-ci soit influencé par l'activité neuronale provenant de l'expérience sensorielle. L'innervation GABAergique est facilement malléable pendant une fenêtre temporelle limitée, appelée période critique. Une privation sensorielle pendant cette période critique du développement retarde la maturation de l'innervation GABAergique³².

Plusieurs molécules, dont l'expression ou la fonction sont dépendantes de l'activité neuronale, ont été étudiées pour expliquer les mécanismes sous-jacents à la malléabilité de l'innervation GABAergique pendant la période critique de développement. Notamment, l'expression de GAD67, l'enzyme synthétisant 90% des niveaux de base de GABA, est influencée par l'activité neuronale. La maturation de l'innervation GABAergique périsonotique est limitée par un knockdown de GAD67 dans les cellules PV et secourue par le blocage de la recapture de GABA. La transmission GABAergique, par l'entremise des niveaux de GABA, semble promouvoir la synaptogénèse^{32,33}.

L'acide polysialique (PSA) est une autre molécule dont l'expression est dépendante de l'activité neuronale. Les niveaux de PSA diminuent suite à l'ouverture des yeux, ce qui concorde avec le début de la période critique et une augmentation de l'activité corticale. Le rôle de PSA est de masquer temporairement les fonctions des molécules d'adhésion de cellules neuronales (NCAM), importantes entre autres pour la formation de synapses inhibitrices. Donc, lorsque les niveaux de PSA diminuent, le nombre de synapses périsonotiques augmente grâce au dévoilement de NCAM^{32,33}.

1.3.5 Dysfonctions des interneurones corticaux

La neurotransmission GABAergique joue plusieurs rôles dans le cerveau, depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte des interneurones. Pendant le développement des interneurones, la relâche de GABA est un promoteur de leur prolifération, migration et maturation synaptique. Dans le cortex mature, les interneurones sont importants pour la génération et le maintien des activités oscillatoires ainsi que pour moduler la réponse des cellules pyramidales aux signaux excitateurs. Il n'est donc pas étonnant que des troubles neurologiques soient associés à des dysfonctions des interneurones³⁴.

Schizophrénie

La schizophrénie est une condition psychiatrique chronique caractérisée par un spectre de symptômes neurocognitifs, émotionnels et sociaux généralement diagnostiquée vers la fin de l'adolescence ou le début de l'âge adulte. Des études post-mortem sur des patients atteints de schizophrénie ont montré une diminution dans les niveaux de GAD67 dans les cellules PV, ainsi qu'une diminution générale de marqueurs associés à la transmission GABAergique dont GAD67, PV, SOM et le transporteur de GABA GAT1 dans différentes aires corticales. Ces altérations influencent les oscillations gammas, générées par les cellules PV et importantes pour la mémoire de travail³⁵.

Autisme

L'autisme est un trouble neuro-développemental associé à une socialisation et une communication verbale et non-verbale déficientes, ainsi que des comportements répétitifs. Le diagnostic se fait avant l'âge de 3 ans. Des travaux sur des modèles animaux et des études post-mortem sur des patients atteints d'autisme ont identifié une

dysfonction dans la transmission GABAergique, dont une diminution de GAD65/GAD67, une diminution de la capacité des benzodiazépines à lier le récepteur GABA_A et une diminution générale des cellules PV dans le cortex. De plus, environ 30% des patients atteints d'autisme souffrent également d'épilepsie³⁴ (voir «épilepsie» ci-dessous).

Épilepsie

L'épilepsie est un désordre neurologique défini par un condition neurologique favorisant des convulsions récurrentes et non-provoquées. Il existe un large spectre de causes et de symptômes épileptiques dont le syndrome le plus fréquent est l'épilepsie du lobe temporal (TLE). Le TLE est considéré comme une condition acquise déclenchée par un facteur précipitant comme un traumatisme crânien, une infection, une tumeur ou une convulsion non-contrôlée. Ces facteurs précipitant sont suivis d'un période sans convulsions appelé épileptogénèse, pendant laquelle il se passe des changements aux niveaux des voies de signalisations moléculaires, une réorganisation des circuits neuronaux et une mort cellulaire. La phase épileptique est caractérisée par des décharges synchronisées anormales de larges populations de neurones se présentant comme des convulsions. Puisque plusieurs agents antiépileptiques accroissent la transmission GABAergique et que des activités épileptiformes peuvent être provoquées en bloquant la transmission GABAergique, il est supposé qu'une dysfonction des interneurons est impliquée dans les mécanismes sous-jacents au TLE et d'autres syndromes épileptiques^{22,36,37}.

Plusieurs études ont montré que des types d'interneurones sont spécifiquement affectés dans des modèles animaux de TLE et chez les humains. Le nombre de cellules SOM est diminué dans l'hilus du gyrus denté dans l'hippocampe, alors que l'arborisation axonale des cellules SOM survivantes augmente dans la couche moléculaire du gyrus denté. De plus, des mutations dans des gènes exprimés exclusivement ou presque

exclusivement dans les cellules PV et codant pour des canaux ioniques ont été trouvées chez des patients souffrant d'épilepsie. Par exemple, une mutation dans le gène SCN1A codant pour la sous-unité Na_v1.1 du canal sodium dépendent du voltage, cause différents syndromes épileptiques. Ce canal semble particulièrement enrichi dans le segment initial de l'axone des cellules PV du cortex chez le rat²².

1.4 Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)

Le carburant de la cellule, l'adénosine triphosphate (ATP), produit de l'énergie par le clivage d'un de ses phosphates. Le produit de l'hydrolyse de l'ATP est l'adénosine diphosphate (ADP) qui lui-même peut être hydrolysé en adénosine monophosphate (AMP). Sur le principe d'une batterie rechargeable, l'ADP et l'AMP sont re-phosphorylés en ATP par la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Puisque ce processus est dépendant de l'oxygène pour fonctionner, une diminution de la disponibilité de l'oxygène provoque une accumulation d'AMP dans la cellule. Ce dérèglement active directement le senseur d'énergie, *l'adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK) qui orchestre le rétablissement des niveaux d'énergie cellulaire en augmentant les voies cataboliques (productrices d'énergie) tout en diminuant les voies anaboliques (dépenses d'énergie) dans le but de protéger la cellule d'une crise énergétique³⁸.

La protéine est faite de trois sous-unités (alpha (α), bêta (β), gamma (γ)) codées par différents gènes. La figure 3 résume les mécanismes d'activation d'AMPK. La sous-unité α est responsable de l'activité kinase de la protéine et contient son site d'activation. La phosphorylation de la thréonine 172 par une des AMPK kinases (AMPKKs) augmente de plusieurs centaines de fois l'activité de la protéine. La sous-unité α existe sous deux isoformes : $\alpha 1$ et $\alpha 2$. La sous-unité $\alpha 2$ est la plus abondante dans le neurone, se localise en partie au noyau, et est considérablement plus sensible à des changements de concentration d'AMP que la sous-unité $\alpha 1$. La sous-unité β est l'attache entre les sous-

unités α et γ . Outre son domaine de liaison aux autres sous-unités, il contient un domaine de liaison au glycogène dont la fonction est encore incertaine, notamment dans le neurone dont les réserves de glycogène sont quasi nulles. La sous-unité γ joue le rôle modulateur dans l'activation de la protéine, celui de la jauge énergétique, puisqu'elle contient des domaines de liaison à l'AMP, l'ADP et l'ATP. La liaison d'une molécule d'AMP change la conformation allostérique d'AMPK augmentant ainsi d'une autre dizaine de fois l'activité de la protéine. Son activation est prolongée en diminuant la déphosphorylation par des phosphatases de la thréonine 172 lors de la liaison d'une molécule AMP ou d'ADP. La liaison d'une molécule d'ATP a l'effet inverse, soit de promouvoir la désactivation de la protéine. L'activation de AMPK est donc très rapide et étroitement régulée pour faire face à une crise énergétique et un changement dans la demande métabolique³⁹.

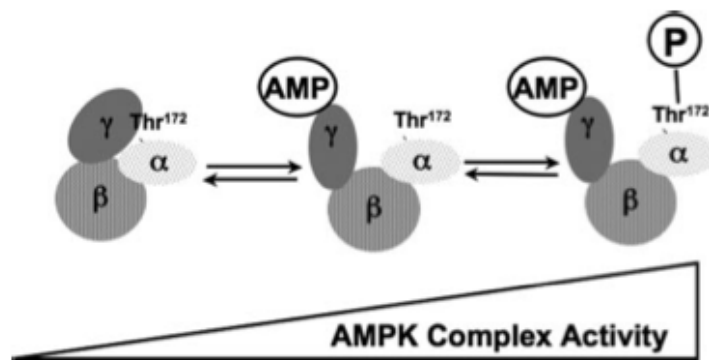


Image 3 : Activation de AMPK. La protéine AMPK est composée de 3 sous-unités distinctes : la sous-unité α est responsable de l'activité enzymatique, la sous-unité β connecte les sous-unités α et γ , et la sous-unité γ lie l'AMP. La liaison d'une molécule d'AMP à la sous-unité γ augmente l'activité de la protéine en plus de favoriser la phosphorylation de la thréonine 172 de la sous-unité α . La phosphorylation de la thréonine 172 augmente considérablement l'activité d'AMPK. Adapté de *Young, 2008*⁴⁰.

Plusieurs outils et approches génétiques ont été développés pour étudier le rôle d'AMPK. Les composés chimiques les plus utilisés pour activer AMPK en recherche sont le 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR), un analogue de l'AMP, la metformin et la phenformin, des biguanides utilisés dans le traitement du diabète et le 2-Deoxy-D-glucose (2DG), un inhibiteur de la glycolyse. Il est également possible d'activer

AMPK *in vitro* en induisant une privation de glucose, d'oxygène ou de nutriments. Génétiquement, la mutation du site de phosphorylation, la thréonine 172 en alanine, et l'ablation du domaine auto-inhibiteur de la sous-unité α rend la protéine constitutivement active. L'inhibition pharmacologique de AMPK se fait par le Compound C, un composé pyrrazolopyrimidine agissant comme compétiteur de l'ATP ou le C75, un inhibiteur de l'acide gras synthase. Génétiquement, la mutation en arginine de la lysine 45 conservée dans l'évolution chez les kinases rend la protéine inactive et agit comme un dominant négatif³⁸.

1.4.1 Cibles neuronales d'AMPK

Une fois activée, AMPK peut aisément jouer son rôle de gardien de l'homéostasie énergétique en phosphorylant ses cibles. L'AMPK est exprimée de manière ubiquitaire et module différentes protéines selon le type cellulaire. Seules les cibles pertinentes aux neurones seront décrites dans ce mémoire⁴¹.

GLUT3

AMPK permet l'entrée de glucose dans la cellule. Une étude *in vitro* montre que les niveaux membranaires du transporteur de glucose neuronal GLUT3 ainsi que les niveaux de phosphorylation d'AMPK augmentent lorsque des neurones granuleux du cervelet sont stimulés par le glutamate. L'inhibition d'AMPK bloque cette translocation de GLUT3 à la membrane en réponse au glutamate, mais les mécanismes par lesquels AMPK permet le transport de GLUT3 sont encore inconnus⁴².

Mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase

En plus de faire entrer des substrats énergétiques dans les neurones, AMPK permet la sauvegarde d'énergie en inhibant la production de protéines. AMPK est un inhibiteur de

la voie de signalisation mTOR, une sérine/thréonine kinase conservée au cours de l'évolution et est une voie de signalisation centrale pour la translation de protéines dont les substrats les mieux étudiés sont la ribosomal protein S6 kinase (S6K) et le facteur d'initiation 4E (eIF4E). Dans des conditions de déplétions énergétiques, AMPK inhibe cette voie de signalisation soit en phosphorylant Raptor, un partenaire de liaison de mTOR, soit en activant *Tuberous Sclerosis Protein 1* (TSC1), un inhibiteur en amont de mTOR. Ceci engendre une diminution de la production de protéine et une économie d'énergie pour la cellule⁴³.

Kv2.1

Outre son rôle dans la régulation du métabolisme, des données récentes montrent qu'AMPK régule l'excitabilité des membranes en phosphorylant le canal potassique Kv2.1. Ce canal est important pour le courant potassique à rectification retardé et son activation mène à une augmentation de la phase de repolarisation des potentiels d'action. Il a été proposé que sa localisation stratégique dans le soma et les dendrites proximales lui permet de diminuer le passage du potentiel d'action vers l'axone. AMPK active le canal en le phosphorylant et rend ainsi le potentiel de membrane plus négatif, diminuant les chances d'atteindre le seuil d'excitabilité et conséquemment conserve l'énergie. En effet, une étude faite par Ikematsu *et al.* montre que le canal Kv2.1 a au moins un site directement phosphorylé par AMPK et que la mutation de ce site annule les effets d'AMPK⁴⁴.

GABA_B

Dans le même ordre d'idées, AMPK phosphoryle la sous-unité R1 du récepteur métabotrope GABA_B, ce qui stabilise le complexe à la membrane plasmique et maintient l'inhibition synaptique. Le récepteur GABA_B permet une inhibition synaptique beaucoup plus lente et prolongée que le canal GABA_A principalement par leur activation des canaux GIRKs post-synaptiques et l'inhibition des canaux calciques voltage-

dépendant pré-synaptiques. L'augmentation de l'inhibition mène donc à une conservation de l'énergie en diminuant les chances de dépolarisation des neurones post-synaptiques⁴⁵.

1.4.2 Rôle d'AMPK en condition physiologique et pathophysiologique

De part sa capacité d'être activé par l'AMP, AMPK serait capable d'être activé en condition physiologiques ou pathophysiologiques. Le cerveau est un organe énergivore : il consomme un peu plus de 20% de l'énergie totale (ATP) bien qu'il ne représente que 2% de la masse corporelle. Cela s'explique par la grande demande énergétique des neurones lorsqu'ils émettent des potentiels d'action et relâchent des neurotransmetteurs, comparables à la demande en ATP des muscles d'un marathonien. De plus, les neurones n'emmagasinent pas l'énergie sous forme de glycogène ou d'acide gras, à la différence des cellules du système périphérique, et doit donc maintenir un influx d'énergie constant dans les neurones. En condition physiologique, AMPK est particulièrement bien équipée pour 'sentir' l'activité neuronale et répondre efficacement aux changements énergétiques transitoires des neurones^{41,42,46}.

Par contre, le rôle d'AMPK en condition pathophysiologique, bien que plus étudié, est moins bien compris. Bien qu'il semble instinctif qu'une activation d'AMPK pendant une déplétion énergétique cellulaire devrait être protecteur, il n'en n'est pas toujours le cas. Par exemple, en conditions expérimentales d'épisode hypoxique-ischémique *in vitro*, les conséquences de l'activation ou l'inhibition d'AMPK diffère d'une étude à l'autre. Dans presque la moitié des études, l'activation d'AMPK en condition de déplétion énergétique semble être neuroprotecteur et l'inhibition d'AMPK semble être néfaste, alors que l'autre moitié des études montre le contraire. Récemment, des études *in vivo* ont montré que l'inhibition d'AMPK ou le knockout de la sous-unité $\alpha 2$, dans un modèle d'ischémie, diminue significativement la taille de l'infarctus, alors que l'activation d'AMPK augmente

la taille des dommages ischémiques. Il est donc possible que l'activation d'AMPK soit dangereuse dans certaines conditions pathophysiologiques dans les neurones⁴¹.

1.4.3 Rôle d'AMPK dans le développement neuronal

Puisque AMPK semble avoir un rôle en condition physiologique dans les neurones, il est intéressant d'étudier le rôle d'AMPK dans le développement du cerveau. Malheureusement, il n'existe que quelques études et les conclusions de celles-ci divergent. *Dasgupta* et *Milbrandt* montrent que les souris exprimant une sous-unité $\beta 1$ inactivée par la fusion avec la β -galactosidase, ont une atrophie du gyrus denté et du cervelet ainsi qu'une perte importante de neurones d'oligodendrocyte et de myélination⁴⁷. Par contre, l'inactivation de la sous-unité $\beta 1$ par un autre mécanisme dans une souris transgénique ne montre aucun défaut de développement. De plus, les animaux portant des délétions des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$, ou une délétion de la sous-unité $\beta 2$ ne montrent pas de défaut de développement neuronal, indiquant que l'effet observé par *Dasgupta* et *Milbrandt* était probablement due à la protéine de fusion plutôt qu'à la perte de la sous-unité $\beta 1$ ⁴¹. Par contre, une étude *in vitro* sur des neurones corticaux knockout pour la sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ a montré que bien que les neurones corticaux se développent normalement sans l'aide d'AMPK, la formation de l'axone est inhibée dans des conditions de stress métabolique⁴⁸. Finalement, il a été montré par *Amato* et al. que l'activation d'AMPK pendant la phase 2 de la polarisation axonale perturbe le transport de PI3K, par phosphorylation de la chaîne légère de la protéine motrice KIF5, jusqu'au cône de croissance de l'axone et annule la polarisation axonale ou raccourcit l'axone⁴⁹. Ces données supportent l'hypothèse qu'AMPK serait dangereux pour les neurones, particulièrement dans les neurones en développement en condition de déplétion énergétique⁴¹.

1.5 Objectifs et hypothèses de recherche

L'EHI cause des milliers de victimes à travers le monde chaque année. Les enfants survivants à un épisode hypoxique-ischémique sont à risque de développer des problèmes neurologiques incapacitants comme une paralysie cérébrale, un retard mental, une épilepsie ou des troubles d'ordre comportemental. Les modèles animaux ont amélioré nos connaissances sur les mécanismes sous-jacents aux dommages cérébraux, mais encore trop peu est connu pour être capable de prévenir les problèmes neurologiques. Ce projet vise à comprendre l'effet de l'hypoxie et l'activation d'AMPK sur les circuits GABAergiques en développement chez la souris.

La neurotransmission GABAergique joue plusieurs rôles dans le cerveau, depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte des interneurones, et une dysfonction des interneurones a été associée à plusieurs troubles neurologiques, comme la schizophrénie, l'autisme et l'épilepsie. La maturation des circuits GABAergiques se fait majoritairement pendant la période post-natale et est hautement dépendante de l'activité neuronale et de l'expérience sensorielle. Notre première hypothèse est que le lourd fardeau en demande énergétique d'un épisode asphyxique périnatale peut causer une mort neuronale sélective de certains interneurones et/ou compromettre l'intégrité de la maturation du réseau inhibiteur GABAergique. Nos objectifs spécifiques sont 1) déterminer s'il y a une perte de cellules PV ou SOM dans l'hippocampe et dans le cortex de jeunes souris ayant subi un épisode asphyxique et 2) s'il y a perte de cellules GABAergiques, déterminer la nature de la perte neuronale.

Puisque les cellules PV sont spécifiquement affectées dans la première partie de notre étude, nous avons voulu étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette vulnérabilité. AMPK est un senseur d'énergie qui orchestre le rétablissement des niveaux d'énergie cellulaire dans le cas d'une déplétion énergétique en modulant des voies de signalisation impliquant la synthèse de protéine et l'excitabilité membranaire. Il est

possible que l'activation d'AMPK suite à une insulte asphyxique périnatale associée à des convulsions soit néfaste à long-terme pour le circuit GABAergique en développement. Notre deuxième hypothèse est que l'activation d'AMPK modifie l'établissement de l'innervation périsonmatique d'une cellule PV sur les cellules pyramidales. Notre objectif spécifique est d'étudier si l'activation ou l'abolition de l'activation d'AMPK peut altérer le développement axonal des cellules PV pendant différentes phases critiques.

2. Étude de l'impact d'une insulte asphyxique périnatale associée à des convulsions sur le développement des interneurons corticaux

2.1 Méthodologie

2.1.1 Modèle

L'image 4 montre une photographie et un schéma de la chambre hypoxique utilisée pour le traitement. L'appareil comprend une chambre, une bonbonne de nitrogène et un contrôleur d'oxygène. Le contrôleur d'oxygène reçoit de l'information constante sur le niveau d'oxygène de la chambre hypoxique et ajuste l'infusion de nitrogène en conséquence. Le traitement consiste à placer les souris à P8 ou P9 dans la chambre hypoxique pendant 10 minutes et de faire descendre les niveaux d'oxygène rapidement de 8% à 3%. Les souris montrent des signes cliniques de convulsions (épisodes myocloniques, mouvements répétitifs des membres arrières, retournement sur le dos) lorsque le niveau d'oxygène atteint 4% jusqu'à devenir catatoniques. Ces signes cliniques ont préalablement été corroborés avec des enregistrements électroencéphalographiques (EEG) (figure 1A). Des enregistrements EEG ont également préalablement montré que les souris ont des convulsions spontanées à l'âge adulte, entre P80 et P120 (figure 1B). La figure 1C montre un résumé du nombre de convulsions (EEG anormale plus de 5 secondes associé à signes comportementaux de convulsions) et du nombre de myoclonies (EEG anormal pendant 5 secondes ou moins) pour chaque animal. Les souris contrôles (CTRL) sont gardées hors de la cage à l'air de la pièce, pendant la durée de l'hypoxie des souris de la même portée.

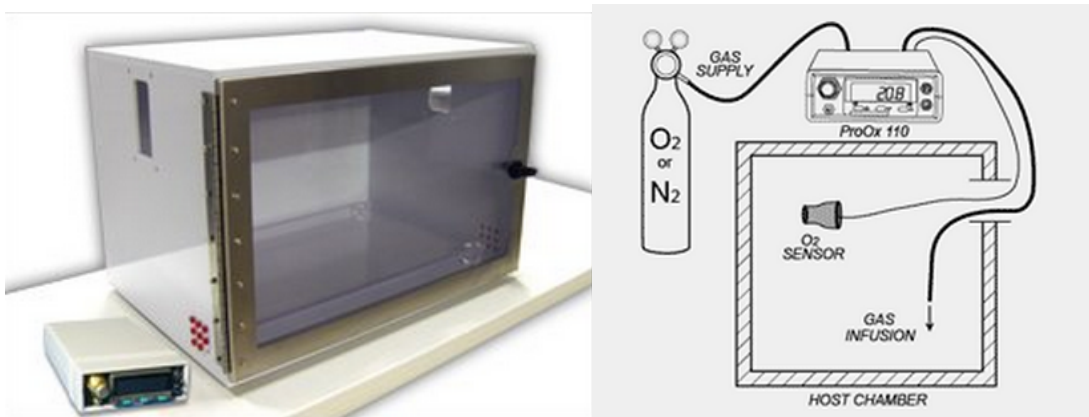


Image 4 : Photographie et schéma de la chambre hypoxique. L'appareil comprend une chambre, une bonbonne de nitrogène et un contrôleur d'oxygène. Le contrôleur d'oxygène reçoit de l'information constante sur le niveau d'oxygène de la chambre hypoxique et ajuste l'infusion de nitrogène en conséquence. Image modifiée à partir de <http://www.biospherix.com>.

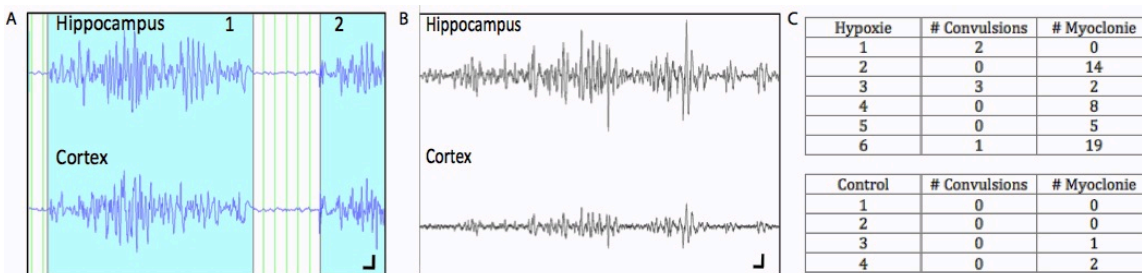


Figure 1 : Exemples d'enregistrements EEG et résumé des convulsions et des myoclonies pour chaque animal. (A) Exemple d'enregistrement EEG dans l'hippocampe et dans le cortex pendant l'insulte hypoxique montrant une convulsion affectant les deux régions. (B) Exemple d'enregistrement EEG dans l'hippocampe et dans le cortex de souris HYP à l'âge adulte montrant une convulsion spontanée affectant les deux régions. (C) Table montrant le résumé des convulsions et des myoclonies spontanées des souris HYP et CTRL pendant la durée de l'enregistrement EEG à l'âge adulte.

2.1.2 Préparation des animaux et des tissus

Animaux

La lignée de souris wild-type *FVB/NJ* utilisée provient de la compagnie *Jackson Laboratory*. Cette lignée est de type consanguine et albinos. La lignée de souris transgénique *CB6-Tg(Gad1-EGFP)G42Zjh/J* de *Jackson Laboratory* est hémizigote pour le transgène *Gad67-GFP* (communément appelé lignée *G42*) et exprime sélectivement EGFP dans les neurones exprimant la PV (soma, dendrites, axones, boutons présynaptiques). L'expression de EGP est restreinte à environ 50% des neurones exprimant PV à l'âge adulte.

Sacrifice des animaux

Les animaux ont tous été sacrifiés entre P40 et P45, excepté pour les expériences de détection d'apoptose où les animaux ont été sacrifiés 24h ou 48h après le traitement hypoxique. Les animaux ont d'abord été endormis avec une dose de kétamine/xylaxine, puis perfusés dans le cœur avec 0.1M de saline tampon phosphate (PBS) suivi d'une solution de 4% paraformaldéhyde. Les cerveaux ont été retirés, fixés durant la nuit à 4°C dans une solution de 4% formaldéhyde, puis cryoprotégés dans une solution de 30% sucrose dans 0.1M PBS à 4°C jusqu'à ce qu'ils ne flottent plus (environ 48h). À ce point, les cerveaux ont été montés dans un medium pour congélation de tissus et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Sectionnement des cerveaux

Les cerveaux ont été sectionnés en sections de 40µm d'épaisseur et disposés dans une plaque de 24 puits en 5 séries alternantes dans 0.1M PBS. Pour la stéréologie, l'hémisphère gauche a été sectionné dans un plan coronal pour l'étude du cortex et l'hémisphère droit a été sectionné dans un plan sagittal pour l'étude de l'hippocampe. Les cerveaux utilisés pour l'étude de l'immunoréactivité de la PV et KV3.1b sur les souris

WT et G42 ont été coupés dans un plan coronal sans séparer les hémisphères. Finalement, pour les expériences d'apoptose, les hémisphères ont été séparés et coupés sur un plan sagittal. Les séries qui n'ont pas été utilisées immédiatement pour l'immunohistochimie ont été conservées dans une solution de 50% éthylène glycol, 4% polyvinylpyrrolidone et 15% sucrose à -20°C pour une utilisation ultérieure.

Immunohistochimie

DAB Les sections ont premièrement été traitées avec une solution aqueuse de 50% d'éthanol et 0.5% de peroxyde d'hydrogène pour bloquer la peroxydase endogène. Les sections ont ensuite été pré-incubées dans une solution de 5% sérum de singe normal (DKS) ou sérum de chèvre normal (NGS), 0.1% Triton X-100 dans 0.1 PBS pour 2 heures à température pièce. La solution a alors été remplacée par la solution d'anticorps primaires (souris anti-PV, 1:1000, Sigma; ou chèvre anti-SOM, 1:100, Chemicon) contenant 1% DKS ou NGS, 0.1% Triton X-100 dans 0.1 PBS pendant la nuit à 4°C. Les sections ont été rincées (3X10 min) dans 0.1M PBS. Les sections ont ensuite été incubées avec un anticorps biotinylé anti-souris ou anti-chèvre (1:200) contenant 1% DKS ou NGS, 0.1% Triton X-100 dans 0.1 PBS pendant 2 heures à température pièce. Les sections ont ensuite été rincées (3X10 min) dans 0.1M PBS. La visualisation de l'anticorps secondaire a été faite avec un complexe avidine-biotine-peroxydase et révélée par glucose oxidase-diaminobenzidine (DAB). Les sections ont été montées sur des lames gélatinées et séchées à l'air avant d'être déshydratées dans une série de bains aux gradients d'éthanol ascendants, puis dans un bain de xylène et couvert de *Permount*. Une fois monté, les lames sont conservées à température pièce.

Fluorescence Les sections ont été pré-incubées dans une solution de 5% sérum de NGS, 0.1% Triton X-100 dans 0.1 PBS pour 2 heures à température pièce. La solution a alors été remplacée par la solution d'anticorps primaires (souris anti-PV, 1:1000; ou lapin anti-Kv3.1b, 1:500; ou lapin anti-caspase-3 clivée, 1:500) contenant 1% NGS, 0.1% Triton X-100 dans 0.1 PBS pendant la nuit à 4°C. Les sections ont été rincées (3X10 min)

dans 0.1M PBS. Les sections ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire-Alexa 555 anti-souris ou anti-lapin (1:400) contenant 1% ou NGS, 0.1% Triton X-100 dans 0.1 PBS pendant 2 heures à température pièce. Les sections ont ensuite été rincées (3X10 min) dans 0.1M PBS et montées sur lame avec du *Vectashield*. Une fois montées, les lames sont conservées à 4°C.

2.1.3 Analyse des résultats

Séréologie

La méthode de stéréologie par dissecteur optique permet une estimation du nombre d'objets tridimensionnels dans un volume donné. En stéréologie, l'échantillonnage est non-biaisé puisque chaque objet a la chance de faire partie de l'échantillon et aucun objet ne peut être compté plus d'une fois. Cette technique est donc appropriée pour l'estimation du nombre de cellules PV et SOM dans la région CA1 hippocampique et dans le cortex visuel primaire (V1). L'image 5 donne un exemple de la méthode de stéréologie par dissecteur optique.

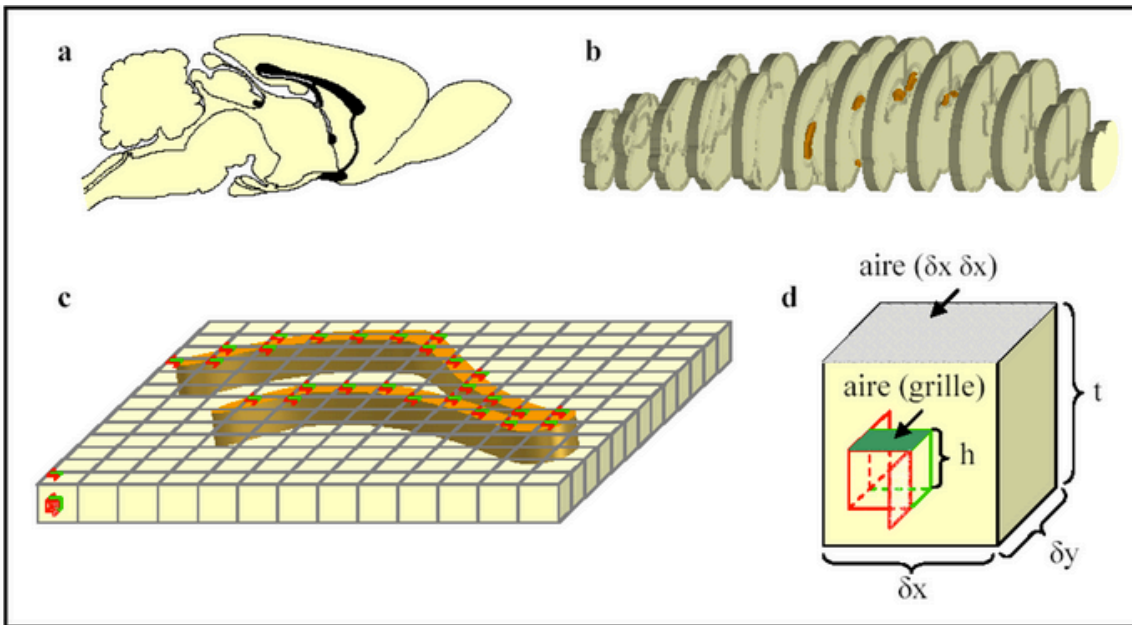


Image 5 : Représentation schématique de la méthode de stéréologie par dissecteur optique. (A) Vue sagittale du cerveau. (B) Dans cet exemple, le cerveau est coupé en sections coronales. Une série de sections sera utilisée pour l'immunohistochimie. (C) Image représentant une grille tridimensionnelle de dimension prédéfinie placée au hasard à l'aide du logiciel StereoInvestigator sur la région désirée du cerveau. Chaque cube de la grille contient un dissecteur optique. (D) Le dissecteur optique comprend trois faces d'inclusion (vertes) et trois faces d'exclusion (rouges). Les cellules à l'intérieur du dissecteur optique ne touchant à aucune face d'exclusion ou touchant aux faces d'inclusion seront comptées.

Les protocoles de préparation des tissus sont discutés dans la section précédente. Brièvement, les cerveaux ont été coupés à 40µm et une fraction de ces coupes a été utilisée pour l'immunomarquage et l'échantillonnage (voir table 1). Le logiciel *StereoInvestigator* a été utilisé pour l'étude stéréologique. Chaque aire a été délimitée sous un objectif 10X. L'échantillonnage avec le dissecteur optique été fait avec un objectif 100X à immersion à l'huile. Le dessus de la tranche a été défini manuellement comme le premier plan focal net et une zone de garde de 1µm a été placée entre ce plan focal et le dissecteur pour éviter de compter des cellules endommagés ou incomplètes. Les paramètres nécessaires à l'échantillonnage non-biaisé ont été trouvés par une étude pilote pour assurer que le coefficient d'erreur de Gundersen soit plus petit que 10% (voir table 2). Le CE de Gundersen est la valeur la plus couramment utilisée pour déterminer la précision de l'estimation de la population étudiée. L'analyse a été effectuée par un seul investigateur ne connaissant pas dans quel groupe se trouvait l'animal.

Table 2. Paramètres utilisés pour l'étude stéréologique

	Coupe	Fraction d'échantillonnage des sections	Nombre de sections/animal	Nombre d'animaux	Q moyenne	F	CE moyenne
CA1 PV	Sag	1/10	7±1	5 CTRL	0.4	>200	0.10
				6 HYP	0.4		0.10
CA1 SOM	Sag	1/5	14±1	7 CTRL	0.3	>400	0.08
				6 HYP	0.3		0.09
V1 SOM	Cor	1/10	7±1	5 CTRL	0.9	>100	0.11
				6 HYP	1.4		0.08

Sag, sagittale; Cor, coronal; Q, nombre de neurones échantillonnés par dissecteur; F, nombre de dissecteurs échantillonnés par animal; CE, coefficient d'erreur.

L'estimation du nombre total des cellules PV et SOM dans l'aire corticale V1 et dans l'aire hippocampique CA1 a été calculée par cette équation :

$$N = \sum Q \times ssf^{-1} \times asf^{-1} \times tsf^{-1}$$

- N = estimation du nombre total de neurones
- $\sum Q$ = nombre total de cellules comptées dans les dissecteurs
- ssf = fraction d'échantillonnage des sections (nombre de sections analysées sur le nombre total de sections pouvant être analysées)
- asf = Fraction d'échantillonnage de l'aire (ratio de l'aire analysée sur l'aire totale de la région délimitée sur la section)
- tsf = Fraction d'échantillonnage de l'épaisseur (hauteur du dissecteur / épaisseur de la section)

Analyse quantitative non-stéréologique

L'analyse quantitative des cellules SOM du gyrus denté et celle des neurones positifs pour caspase-3 n'ont pas été possibles par analyse stéréologique dû à l'impossibilité de garder les paramètres minimums requis pour une telle analyse tout en ayant un CE de moins de 10%. L'analyse quantitative des cellules SOM du gyrus denté a été effectuée à l'aide du logiciel StéréoInvestigator sur les mêmes sections que l'étude stéréologique du CA1. L'aire de l'hilus a été tracée sous un objectif 20X et les cellules SOM ont été quantifiés manuellement. Le calcul du nombre de neurones par aire (μm^2) échantillonnée été calculé avec cette équation :

$$N = \sum Q \times as^{-1}$$

- N = nombre de neurones / aire échantillonnée
- $\sum Q$ = nombre total de cellules comptées dans les sections
- as = Aire échantillonnée

L'analyse de la mort neuronale par apoptose a été effectuée par immunomarquage de la caspase-3 clivée. Les neurones positifs pour la caspase-3 clivée ont été comptabilisés manuellement sous un objectif 20X.

Calcul de l'incidence des trous PV

Le calcul de l'incidence des trous PV a été effectué en calculant le nombre d'animaux affecté d'au moins un trou PV. Nous avons défini une perte de PV comme un trou PV si elle s'étendait sur au moins 3 sections consécutives. L'expérience comporte des souris provenant des lignées FVB et G42.

Statistiques

Les différences entre plusieurs groupes ont été évaluées avec le test d'ANOVA à un facteur contrôlé. Les différences entre deux groupes ont été évaluées avec le test t de Student. Nous avons considéré qu'il y avait une différence significative entre les groupes lorsque $P < 0.05$.

2.2 Résultats

Nous avons voulu investiguer le sort des interneurones à l'âge adulte (P40) chez des souris ayant subi 10 min d'hypoxie à P8 ou P9, à l'aide des marqueurs d'expression PV et SOM. Ces deux populations d'interneurones sont non-chevauchantes dans le cortex, i.e. qu'une cellule ne co-exprime jamais les deux marqueurs. Ensemble, ils représentent environ 60% de tous les interneurones corticaux. Étonnamment, le cortex des souris HYP présentait des zones complètement ou fortement dépourvues de cellules PV (ci-après appelé trous PV) (Figure 2). Ces trous PV étaient dispersés dans différentes aires corticales, contraints principalement dans les couches supérieures, mais affectant parfois toute l'épaisseur du cortex. L'immunomarquage contre PV étant sensible aux dommages fait pendant l'extraction du cerveau suite à la fixation, les sections présentant un dommage aux couches superficielles n'ont pas été incluses dans l'analyse. L'incidence des trous PV était plus grande dans les cortex HYP (73%, n=15 animaux) que dans les cortex CTRL (19%, n=16 animaux).

Les cellules PV semblent spécifiquement affectées. Un marquage nucléaire DAPI a montré que la structure du cortex et la superposition des couches dans les trous PV ne semblaient pas affectées (ces données ne sont pas illustrées). La densité de cellules PV hors de ces trous semblait également normale. En plus, pour vérifier si les cellules SOM étaient affectées, nous avons fait un immunomarquage sur une série de sections de cortex provenant des mêmes cerveaux ayant montrés des trous PV et aucun trou n'a été identifié. Nous avons finalement estimé le nombre total de cellules SOM dans le cortex V1 par stéréologie et n'avons trouvé aucune différence significative entre les cortex HYP et CTRL (ANOVA à un facteur contrôlé, $P > 0.05$; figure 3A et 3B).

Le cortex semble spécifiquement affecté puisqu'aucun trou PV ou SOM n'a été identifié dans l'hippocampe des souris HYP. Dans la région CA1, le nombre total de

cellules PV et SOM estimé par stéréologie n'était pas significativement différent entre les groupes CTRL et HYP (test t de Student; $P > 0.05$; Figures 4A, 4B, 4D). Bien qu'une réduction dans le nombre de cellules SOM dans la région CA1 des souris HYP ai été remarquée, cette différence n'a pas atteint le seuil de signification statistique (test t de Student; $p = 0.053$; Figure 4B et 4D). L'estimation du nombre de neurones dans le gyrus denté n'était pas possible par stéréologie car la densité de cellules SOM dans le gyrus denté est trop petite pour atteindre un CE valable. Les cellules SOM de cette région ont donc été comptées sans dissecteur sur la même série utilisée pour l'analyse du CA1. De même, nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les 2 groupes (test t de Student; $P > 0.05$; Figure 4C et 4E).

Nous nous sommes alors demandés si les trous PV relevaient d'une perte de cellules PV ou d'une perte d'expression de PV. Comme première analyse, nous avons effectué un immunomarquage contre la caspase-3 activée, un marqueur couramment utilisé pour l'apoptose, sur des sections de cerveaux fixés 24h et 48h après le traitement hypoxique (figure 5A). Nous avons détecté une augmentation significative, mais faible, de neurones positifs pour la caspase-3 clivée 24h après l'hypoxie dans le cortex (figure 5B). Par contre, ces neurones étaient dispersés dans le cortex et plusieurs étaient identifiés comme étant des neurones pyramidaux. L'apoptose n'est donc probablement pas le mécanisme principal, ou le seul mécanisme, expliquant la présence des trous PV. Pour déterminer si les cellules PV meurent par un autre mécanisme que l'apoptose, ou si l'expression de PV est simplement diminuée, nous avons fait subir le traitement hypoxique à une lignée de souris transgéniques dans laquelle GFP est exprimé dans un groupe de cellules PV (lignée G42) et fait un immunomarquage contre PV. Nous avons constaté une diminution de cellules GFP+ dans les trous PV (figure 6), montrant qu'une partie des cellules PV sont probablement mortes, alors qu'une autre partie n'exprime plus le marqueur PV.

Nous avons investigué pourquoi les cellules GFP+ toujours vivantes dans les trous PV n'expriment pas la PV. Puisque la PV commence à être exprimée seulement autour de la deuxième semaine postnatale chez le rongeur, il est donc possible que la perte d'expression de la PV soit due à une immaturité des interneurons après le traitement hypoxique. Pour tester cette hypothèse, nous avons fait un immunomarquage contre Kv3.1b, un canal potassique dont l'expression est parallèle à celle de la PV pendant la maturation des cellules PV et dont la fonction est importante pour la capacité de déchargement rapide de ces neurones matures. Nous avons trouvé des cellules GFP+ dans les trous PV qui n'exprimaient pas Kv3.1b (figure 7). Par contre, les trous PV dans les cortex HYP ainsi que les cortex CTRL n'ont pas été analysés systématiquement et plus de travail doit être fait pour quantifier les cellules GFP+/PV-/Kv3.1b-.

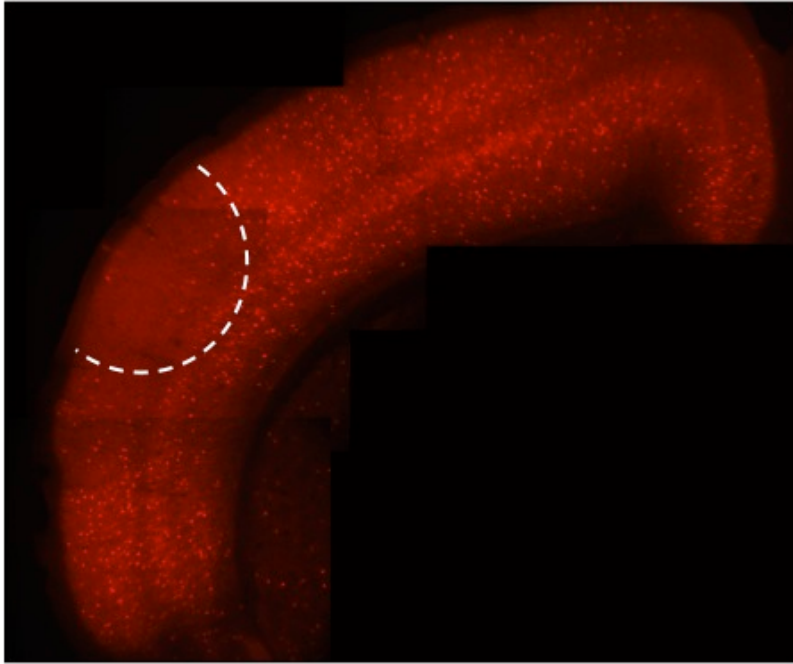


Figure 2 : Reconstitution d'une section de cortex immnuomarké contre PV provenant d'une souris HYP. Le cortex de souris HYP montre des régions sans PV (ligne pointillée; barre d'échelle=500 μ m).

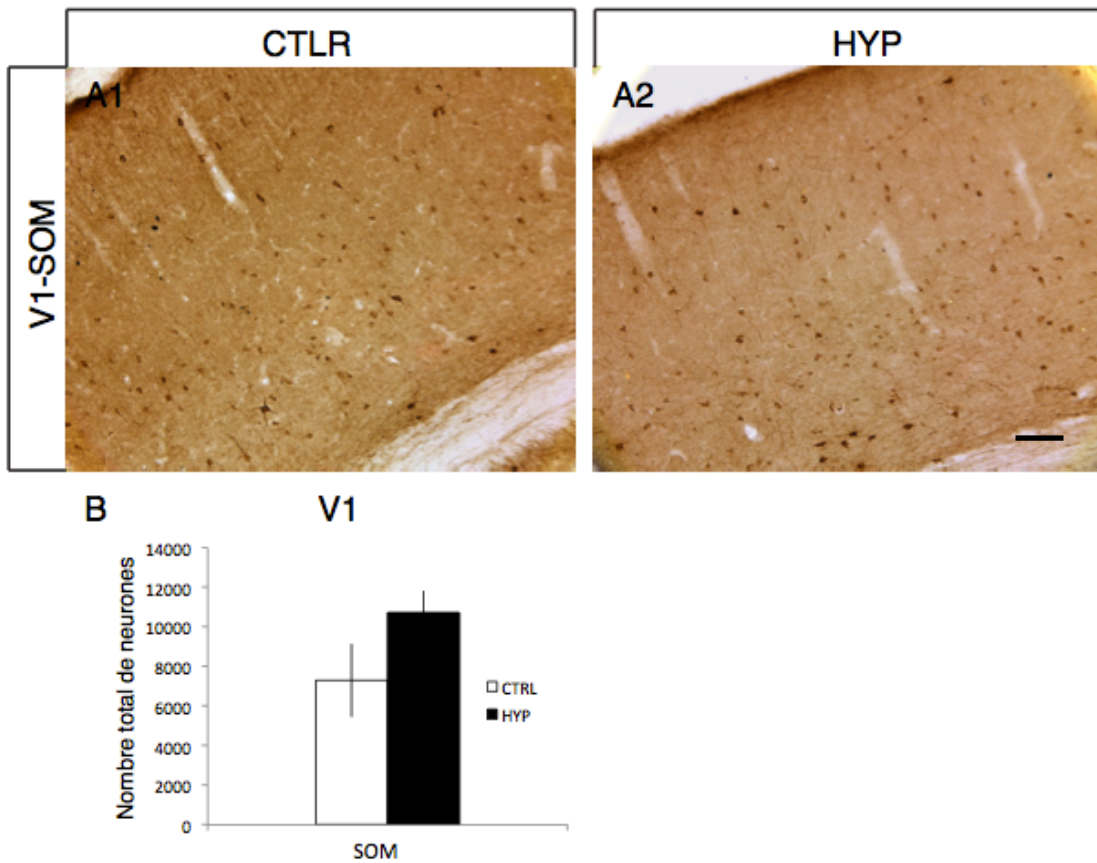


Figure 3: Estimation du nombre de cellules SOM dans le cortex. (A) Immunomarquage des cellules SOM du cortex V1 chez les souris contrôles ou ayant subi le traitement hypoxique (zoom 10X; barre d'échelle=100µm). (B) Les résultats de l'analyse stéréologique par la méthode du dissecteur optique démontrent que le nombre total de neurones SOM+ dans le cortex V1 ne change pas avec le traitement hypoxique (t-test, $p > 0.05$). $n = 6$ CTRL, $n = 7$ HYP.

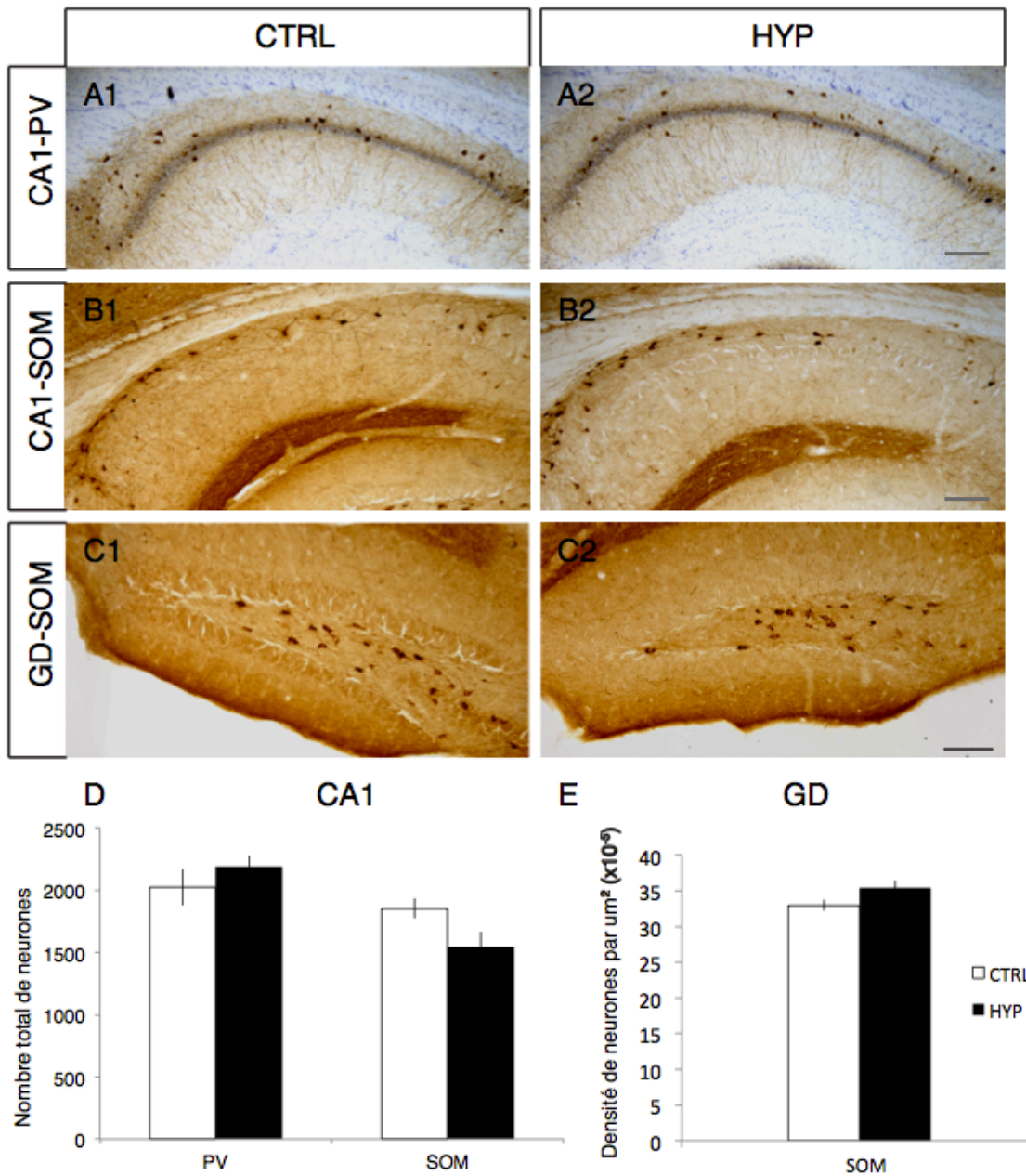


Figure 4 : Estimation du nombre de neurones SOM et PV dans l'hippocampe. (A et B) Immunomarquage des neurones PV et SOM de la région CA1 (zoom 10X; barre d'échelle=200 μ m). (C) Immunomarquage des neurones SOM+ dans l'hilus du GD (zoom 20X; barre d'échelle=100 μ m). (D) Estimation stéréologique par la méthode du dissecteur optique démontrant le nombre total de neurones PV et SOM dans la région CA1 ($P>0.05$). (E) Densité de neurones SOM+ par μm^2 ($\times 10^{-5}$) dans la région du gyrus denté ($P>0.05$).

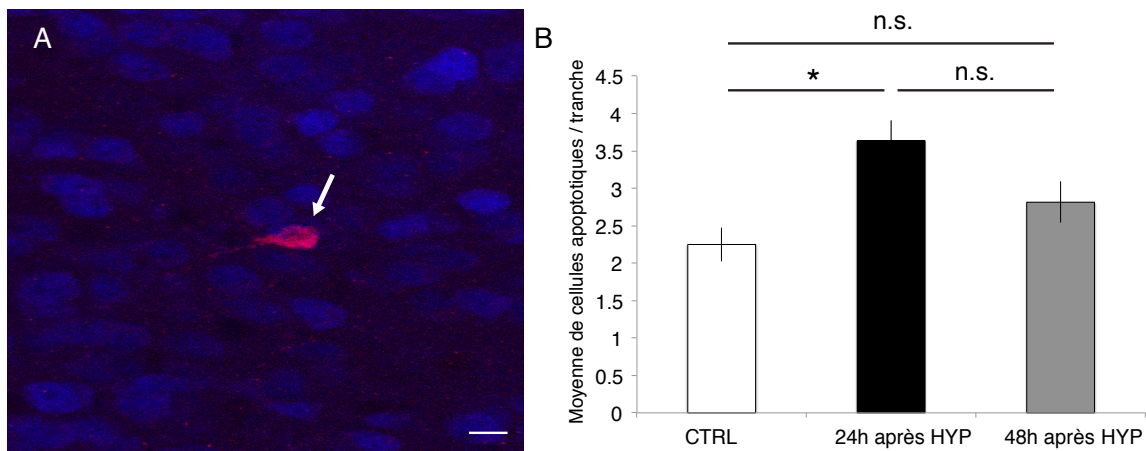


Figure 5 : Estimation de l'apoptose dans le cortex après hypoxie (A) Image confocale d'une cellule immunopositive pour la caspase-3 clivée en rouge (flèche), NeuN en bleu. (B) Nombre moyen de cellules positives pour la caspase-3 clivée par tranche de cortex sagittale de 40µM d'épaisseur 24 heures et 48 heures après induction de hypoxie (entre 12 et 18 sections/animal; CTRL n=3 animaux, 24h n=3 animaux, 48h n=4 animaux; ANOVA, * = P < 0.01).

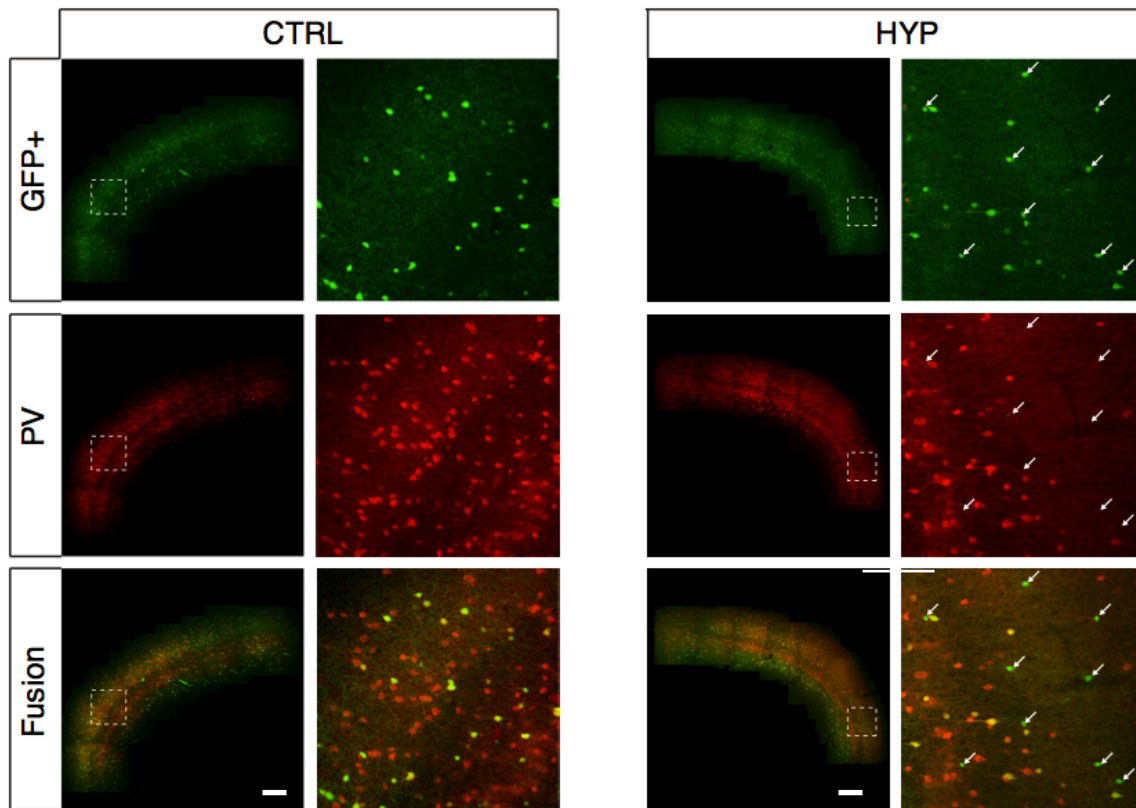


Figure 6 : Reconstitution de sections de cortex provenant d'une souris G42 CTRL et d'une souris G42 HYP. Chez les souris G42 CTRL, toutes les cellules GFP+ colocalisent avec PV, alors que chez les souris G42 HYP, des régions du cortex montrent des cellules GFP+/PV- (flèches). (barre d'échelle : 500 μ m)

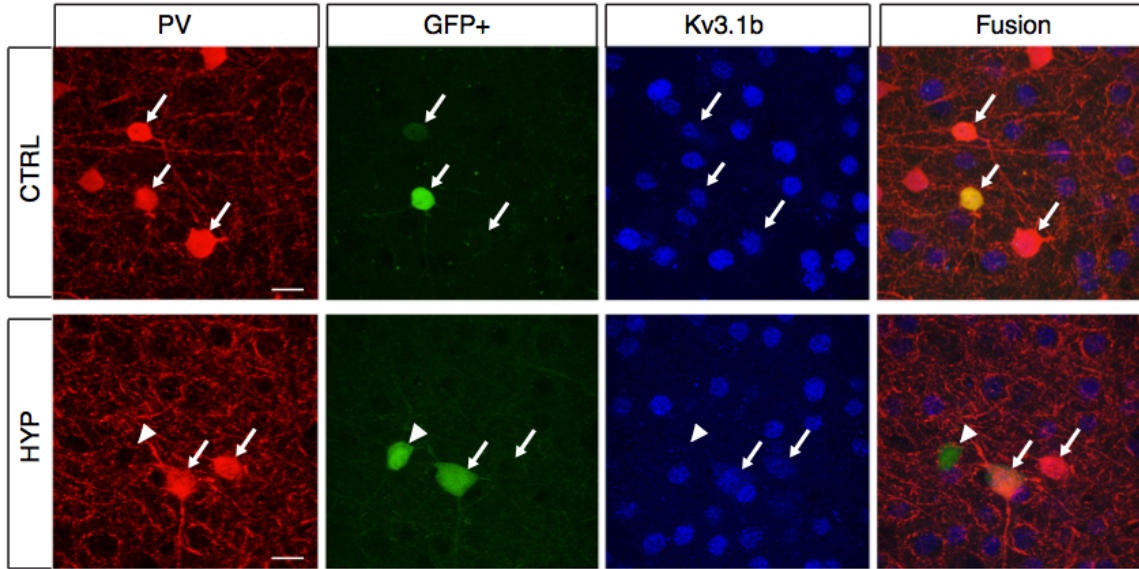


Figure 7 : Immunomarquage contre PV et Kv3.1b de cortex de souris G42 CTRL et HYP. Chez les souris G42 CTRL, toutes les cellules GFP+ colocalisent avec PV et Kv3.1b (flèches), alors que chez les souris G42 HYP, des régions du cortex montrent des cellules GFP+/PV-/Kv3.1b- (tête de flèche). (barre d'échelle : 10 μ m)

2.3 Discussion

Notre groupe et d'autre ont montré l'émergence de convulsions spontanées suite à un court épisode asphyxique périnatal associé à des convulsions chez le rongeur, démontrant une hyperexcitabilité des circuits neuronaux. Nous avons émis l'hypothèse que les circuits GABAergiques sont affectés lors d'un épisode hypoxique dans un cerveau immature. Nos données montrent en effet que l'hypoxie compromet la maturation et la survie des cellules PV spécifiquement dans le cortex, épargnant les cellules SOM. Cette perte de PV, que nous avons nommé trous PV, était restreinte à des zones dans différentes aires corticales, plutôt qu'une diminution généralisée de la densité de cellules PV. Ces résultats ont des implications importantes pour notre compréhension des mécanismes sous-jacents à l'épilepsie et aux troubles cognitifs après un épisode hypoxique néonatal.

Grâce à la grande facilité d'utilisation d'animaux transgéniques dans notre modèle, nous avons pu soumettre des souris exprimant la GFP dans des cellules PV du cortex. Après hypoxie, ces souris montrent clairement une réduction de cellules GFP+ dans les trous PV, indiquant qu'une partie des trous PV sont dus à une mort neuronale, mais que les cellules survivantes n'expriment plus le marqueur PV. Nous avons trouvé une petite augmentation de l'apoptose 24h après l'hypoxie, qui n'était déjà plus significative 48h après l'hypoxie. Les neurones affectés étaient éparpillés dans le cortex et ne présentaient pas le profil des trous PV. Nous pensons que l'apoptose secondaire, un mécanisme de mort cellulaire important dans d'autres modèles hypoxiques-ischémiques, n'est pas le mécanisme principal, ou le seul mécanisme, expliquant la présence des trous PV.

La maturation des cellules PV est particulièrement dépendante du métabolisme énergétique. Pendant la 3^{ème} et 4^{ème} semaine post-natale, les cellules PV commencent à exprimer la PV et acquièrent un phénotype électrophysiologique de décharge rapide en

exprimant des canaux ioniques spécialisés exigeant un grand effort métabolique puisque les potentiels d'action sont extrêmement coûteux en énergie. L'activation de gènes reliés à l'énergie est donc dramatiquement augmentée pendant cette période critique. Il est possible que la déplétion énergétique due à l'épisode hypoxique interrompe la maturation et l'intégration des cellules PV dans le circuit neuronale en développement. Les cellules PV qui n'ont pas intégré le circuit cortical fonctionnel seraient alors éliminées, menant à la mort neuronale des trous PV. De plus, ce mécanisme expliquerait pourquoi les cellules PV sont sélectivement vulnérables dans notre modèle.

Les enfants souffrant d'encéphalopathie reliée à une insulte hypoxique-ischémique sont à risque de développer des troubles neurologiques d'ordre cognitif et comportemental ainsi que l'épilepsie. Il n'est pas étonnant que plusieurs études ont montré que ces troubles neurologiques sont associés à des déficits de la transmission GABAergique puisque celle-ci joue plusieurs rôles dans le cortex mature, soit la modulation de la réponse des cellules pyramidales aux signaux excitateurs et le maintien des activités. Nous pensons que les changements dans le réseau GABAergique observés suite à un épisode asphyxique périnatal associé à des convulsions pourraient contribuer aux problèmes neurologiques associés à l'EHI.

Les bouleversements dans la transmission GABAergique observés dans notre modèle peuvent débalancer l'équilibre excitation/inhibition et favoriser un état épileptique. De plus, l'hypothèse d'une mort neuronale lente suite à un épisode hypoxique concorde avec la période sans convulsions (épileptogénèse) précédant la période épileptique. Cette mort neuronale, ainsi que l'immaturité des cellules PV, peuvent également influencer les oscillations gammas, importantes pour la mémoire de travail, et prédisposer à des troubles cognitifs et comportementaux. Des études sont en cours dans notre laboratoire pour comprendre si l'asphyxie périnatale associée à des convulsions perturbe les oscillations gammas.

3. Étude du rôle d'AMPK sur le développement des interneurons corticaux

3.1 Méthodologie

3.1.1 Clonage

La construction originale du vecteur P_{G67}-EGFP (image 6a) est décrite dans *Chattopadhyaya et al., 2004*⁵⁰. Brièvement, P_{G67}-EGFP a été généré en sous-clonant la région 10kb du gène du promoteur de *Gad1* devant la région codante de pEGFP. Les fragments d'ADNc contenant les formes wild-type et dominante négative (mutation K45R) du gène codant pour la sous-unité $\alpha 2$ (PRKAA2) ont premièrement été sous-clonés dans le site de clonage multiple du vecteur pCI à l'aide du site de restriction EcoR1 flanqué en amont et en aval des ADNc. Les ADNc ont été sorti du vecteur pCI en utilisant les sites de restrictions Sma1 (en aval des gènes) et Xho1 (en amont des gènes). Les fragments contenant les ADNc d'intérêts ont été traité avec une exonucléase pour rendre l'extrémité Xho1 franche. Finalement, les fragments ont été clonés en utilisant le site de restriction PmeI flanqué en aval et en amont de EGFP dans le plasmide P_{G67}-EGFP, excisant du même coup EGFP (image 6b, 6c).

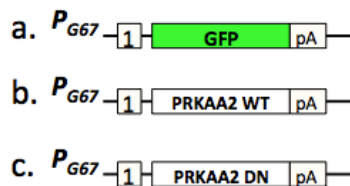


Image 6 : Schéma des plasmides utilisés dans l'étude. (A) P_{G67}-EGFP (B) P_{G67}-AMPK WT (C) P_{G67}-AMPK DN.

3.1.2 Préparation des cultures

Culture organotypique et transfection biolistique

Toutes les cultures ont été faites à partir de souris WT à P4 ou P5. La tête a été décapitée et le cerveau a été rapidement prélevé et immergé dans un milieu de culture DMEM contenant 20% de sérum de cheval, 1 mM glutamine, 13 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 0.5 µM/ml insuline, 30 mM HEPES, 5 mM NaHCO₃, et 0.001% d'acide ascorbique). Les hémisphères ont été séparés et les cortex ont été séparés du reste du cerveau pour être coupés en sections coronales de 400µm à l'aide d'un tranchoir à tissu. Les sections ont été déposées sur des membranes (*Millipore*, Bedford, MA) placées dans des plaques de 6 puits contenant 750µL de milieu de culture et incubées dans un incubateur humidifié à 34°C avec 5% CO₂. Le milieu a été changé trois fois par semaine et toutes les procédures ont été effectuées de façon stérile.

Des projectiles biolistiques ont été fabriqués en collant de 25 à 30µg de chaque plasmide d'intérêt sur des particules d'or de 1.6µm. Pour les expériences contrôle, le plasmide P_{G67}-GFP a été précipité seul sur les particules d'or, alors que les plasmides P_{GAD67}-AMPK WT et P_{G67}-AMPK DN ont été co-précipités avec le plasmide P_{GAD67}-GFP pour permettre leur visualisation. Les cultures ont été transfectées biolistiquement avec ces projectiles par un fusil à gène (Bio-Rad) à haute pression. Pour les expériences d'étude de la phase de formation, la transfection a eu lieu à au jour équivalent post-natal 10 (EP10; 4 jours + 6 jours *in vitro*), soit 5 ou 6 jours après la mise en culture alors que la transfection pour les expériences d'étude de la phase de maturation ont eu lieu à EP16, soit 11 ou 12 jours après la mise en culture. Après la transfection, les cultures sont retournées en incubation sous les mêmes conditions que décrites précédemment. Ce type de transfection donne un faible rendement du nombre de neurones, permettant l'analyse de neurones isolés.

Immunohistochimie

Les sections ont été fixées avec une solution de 4% paraformaldéhyde 6 jours après la transfection biolistique pendant 2 heures à température pièce. Les sections ont ensuite été congelées à -20°C pendant 1 heure dans une solution de PBS 0.1M contenant 30% de sucrose pour augmenter la pénétration des anticorps dans les sections et pré-incubées dans une solution de 10% de sérum normal de chèvre, 1% Triton X-100 dans 0.1 PBS pour 2 heures à température pièce. La solution a alors été remplacée par la solution d'anticorps primaires (souris anti-NeuN, 1 :400; ou souris anti-pS6) contenant 5% NGS, 0.1% Triton X-100 dans 0.1 PBS pendant 3 nuits à 4°C. Les sections ont été rincées (3X10 min) dans 0.1M PBS. Les sections ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire anti-souris-Alexa 555 pour NeuN (1 :400) et anti-souris-Alexa 594 pour pS6 (1:400) dans une solution contenant 1% de sérum normal de chèvre et 0.1% Triton X-100 dans 0.1 PBS pendant 2 heures à température pièce. Les sections ont ensuite été rincées (3X10 min) dans 0.1M PBS et montées sur lame avec du *Vectashield* (milieu de montage). Une fois montées, les lames sont conservées à 4°C.

3.1.3 Analyse des résultats

Acquisition des images

Pour l'analyse de l'innervation axonale, un microscope confocal (LEICA TCS SPE-DM500Q) et un objectif à immersion au glycérol de 63X (LEICA NA 1.4) ont été utilisés pour prendre des images d'interneurones GFP+ bien isolés l'un de l'autre. Deux collections d'images (une image tous les 1µm avec une profondeur moyenne de 40-70µm) de l'arborisation axonale ont été acquises avec zoom 1.5 et un zoom 2 pour chacun des interneurones choisis. Les champs d'acquisition de l'arborisation axonale ont été capturés de façon à ce qu'ils ne se chevauchent pas et qu'ils soient à l'intérieur d'un

périmètre de 200 μ m à partir soma de l'interneurone. Les images ont été exportées en format TIFF.

Pour la quantification de p-S6, les collections d'images (une image tous les 5 μ m) ont été acquises avec les mêmes paramètres confocaux avec un objectif à immersion à l'eau 20X (Leica NA). Les champs d'acquisition ont été sélectionnés selon une pénétrance efficace de l'anticorps anti-p-S6 et les cellules transfectées GFP+ choisies pour l'analyse ne se trouvaient pas à la surface de la tranche organotypique pour éviter d'analyser des cellules endommagées. Les images ont été exportées en format TIFF.

Analyse

À l'aide du logiciel *NeuroLucida* (MicroBrightField), les axones et les boutons des interneurones ont été tracés en trois dimensions autour de chaque soma pyramidal complet et bien isolé. Entre 10 et 20 somas innervés par interneurone ont été analysés et chaque groupe comprend au moins six interneurones provenant de 3 expériences différentes. Une analyse morphométrique tridimensionnelle de Sholl a ensuite été effectuée à l'aide du logiciel *NeuroLucida Explorer* pour étudier la densité de synapses périsonomatiques et la complexité de l'embranchement axonal autour des somas pyramidaux. Cette analyse consiste en l'application de sphères virtuelles concentriques à diamètres croissant de 1 μ m à partir du centre du corps cellulaire de la cellule pyramidale à l'étude. La complexité de l'embranchement axonal a été quantifiée comme le nombre moyen de croisements entre l'axone et chaque sphère de Sholl. L'analyse a été limitée à un rayon de 9 μ m à partir du centre de la cellule pyramidale car la moyenne des rayons des somas immunomarqués par l'anticorps anti-NeuN est approximativement de cette grandeur. La densité des synapses périsonomatiques a été quantifiée comme le nombre de boutons à l'intérieur d'un rayon de 9 μ m à partir du centre de chaque cellule pyramidale. Cette méthode d'analyse automatique permet une estimation non-biaisée du nombre présumé de boutons autour d'un soma pyramidal.

La quantification du ratio d'expression de p-S6 dans les neurones transfectés GFP+ sur les neurones non transfectés a été effectuée à l'aide du logiciel *ImageJ* (*National Institute of Health*). Pour chaque collection d'images, les contours du soma et du noyau de la cellule transfectée GFP+ ont été dessinés et l'intensité moyenne du cytoplasme (soma-noyau) de p-S6 a été mesurée au plan focal où le soma est le plus large. La même opération a été effectuée pour chaque cellule non transfectée au plan focal préalablement sélectionné ou au plan focal supérieur ou inférieur à celui-ci selon la clarté de la cellule. L'intensité du bruit de fond a été soustraite pour chaque cellule. Le ratio des niveaux de p-S6 dans la cellule transfectée versus les cellules environnantes non transfectées a été calculé pour chaque collection d'images et une moyenne a été calculée pour chaque groupe expérimental.

Statistiques

Les différences entre plusieurs groupes ont été évaluées avec le test d'ANOVA à un facteur contrôlé. Nous avons considéré que qu'il y avait une différence significative entre les groupes lorsque $P < 0.05$.

3.2 Résultats

Nous avons voulu examiner l'effet de l'activation d'AMPK sur l'établissement de l'innervation périsomatique d'une cellule PV sur les cellules pyramidales. Pour ce faire, nous avons surexprimé la sous-unité $\alpha 2$ d'AMPK et sa forme mutée DN en culture organotypique de cortex de souris à l'aide d'un promoteur spécifique aux cellules PV. Pour permettre la visualisation des cellules, nous avons effectué une double transfection avec le même plasmide que notre gène, mais contenant une GFP.

Comme première étape, nous avons voulu évaluer les conséquences fonctionnelles d'une surexpression d'AMPK et de sa forme mutée DN dans des cellules PV individuelles en culture organotypique. Des études ont montré que AMPK inhibe la voie de signalisation mTOR, dans le but de diminuer la production de protéines et de conserver l'énergie⁴³. Nous avons donc investigué si la surexpression de la sous-unité $\alpha 2$ d'AMPK est capable d'inhiber la voie de signalisation mTOR et si, au contraire, l'activation de cette voie de signalisation est augmentée lors de la surexpression du mutant DN. Pour ce faire, nous avons fait une immunohistochimie contre la forme phosphorylée de la protéine S6, le marqueur généralement utilisé pour quantifier l'activation de la voie mTOR (figure 8a). Les niveaux de pS6 ont été comparés entre les cellules transfectées et les cellules environnantes non-transfectées. Nous avons trouvé une tendance vers la diminution du ratio de l'intensité de pS6 dans les cellules PV transfectées avec la sous-unité $\alpha 2$ WT comparé avec les neurones CTRL exprimant seulement la GFP, indiquant que la sous-unité serait possiblement active. Cette tendance n'est pas significative parce que le groupe du mutant DN n'est pas complet et les cellules analysées montrent une grande variance dans les niveaux de pS6 (ANOVA à un facteur contrôlé; $P > 0.05$; CTRL $n=6$, WT $n=7$, DN $n=4$; figure 8). L'étude du mutant DN pourra répondre à deux hypothèses, soit le ratio de l'intensité de pS6 augmente, montrant que la forme mutée

abolit l'activité endogène d'AMPK, ou alors le ratio ne change pas, montrant qu'AMPK endogène n'est pas active en culture organotypique dans les cellules PV.

Les profils du développement de l'innervation périssomatique d'une cellule PV sur les cellules pyramidales en culture organotypique ont été décrits précédemment (*Chattopadhyaya, 2004*)⁴³. De telles cultures organotypiques corticales développent un niveau considérable d'activité neuronale spontanée permettant une maturation des cellules PV semblable à la maturation *in vivo*, même en l'absence d'afférences du thalamus. Vers la fin de la phase de formation des synapses au jour équivalent post-natal 18 (EP18 = P4 + 14 jours *in vitro*), l'arborisation axonale a presque atteint sa grosseur maximale et toutes les varicosités sur l'axone colocalisent avec GAD65, mais la présence de protrusions de type filopode indique que l'axone est encore immature. À EP24, l'axone devient plus complexe et fait beaucoup plus d'embranchements et de boutons synaptiques autour des somas pyramidaux.

Dans notre étude, nous avons ciblé ces deux phases du développement synaptique GABAergique, soit la phase de formation (EP10-18) et de maturation (EP18-24). La surexpression de sous-unité $\alpha 2$ WT (formation, n=7; maturation n=6) et du mutant DN (formation, n=4; maturation n=4) n'a pas significativement changé le nombre de boutons synaptiques autour des somas pyramidaux (ANOVA à un facteur contrôlé; $P > 0.05$; figure 9A et 9B). Malheureusement, le groupe DN n'est pas complet et affecte peut-être les résultats. En effet, il semble que l'abolition de l'activité d'AMPK augmente la densité de boutons synaptiques autour des somas lors de la phase de formation EP10-18, mais diminue lors de la phase de maturation EP16-24. La complexité de l'axone, caractérisée par les ramifications localisées autour des somas pyramidaux, ne change pas pendant la phase de formation EP10-18 (ANOVA à un facteur contrôlé; $P > 0.05$ pour chaque rayon), alors que l'axone semble moins complexe pendant la phase de maturation (ANOVA à un facteur contrôlé; $P > 0.05$ pour les rayons 1 à 6 et 9; $P < 0.05$ pour les rayons 7 et 8; figures 9A et 9C). Nous avons également noté que la transfection de la forme WT à EP 10-18

semble désorganiser la stabilisation des synapses (figure 10). Cette désorganisation est caractérisée par des boutons synaptiques de grosseur parfois anormale, des agglomérations de boutons et une grande quantité de petites protrusions. Il semble donc que la surexpression d'AMPK compromet la stabilisation des synapses dans les cellules PV pendant la phase de formation, mais qu'une quantité endogène d'AMPK WT soit nécessaire comme le montre les résultats de la surexpression de la forme DN pendant les phases de formation et maturation. Ce dernier résultat n'est pas confirmé puisque les groupes ne sont pas complets et la différence n'est pas statistiquement significative.

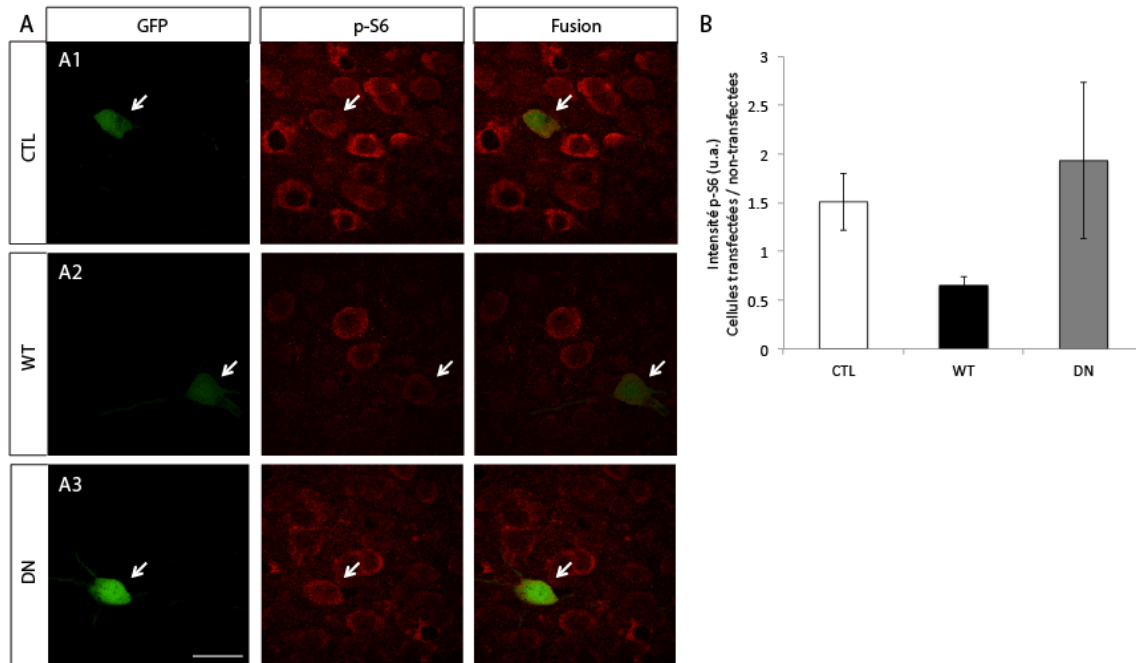


Figure 8 : Évaluation de l'activation de la voie mTOR après surexpression de la forme WT et DN de AMPK en culture organotypique. (A) Cellules PV transfectées (flèches) avec P_{G67}-EGFP (A1), P_{G67}-WT/ P_{G67}-EGFP (A2) et P_{G67}-DN/ P_{G67}-EGFP (A3) et marqué avec un anticorps contre pS6. (B) Intensité de pS6 des cellules transfectées sur l'intensité de pS6 des cellules environnantes non-transfectées (CTRL n=6, WT n=7, DN n=4; ANOVA à un facteur contrôlé, P>0.05).

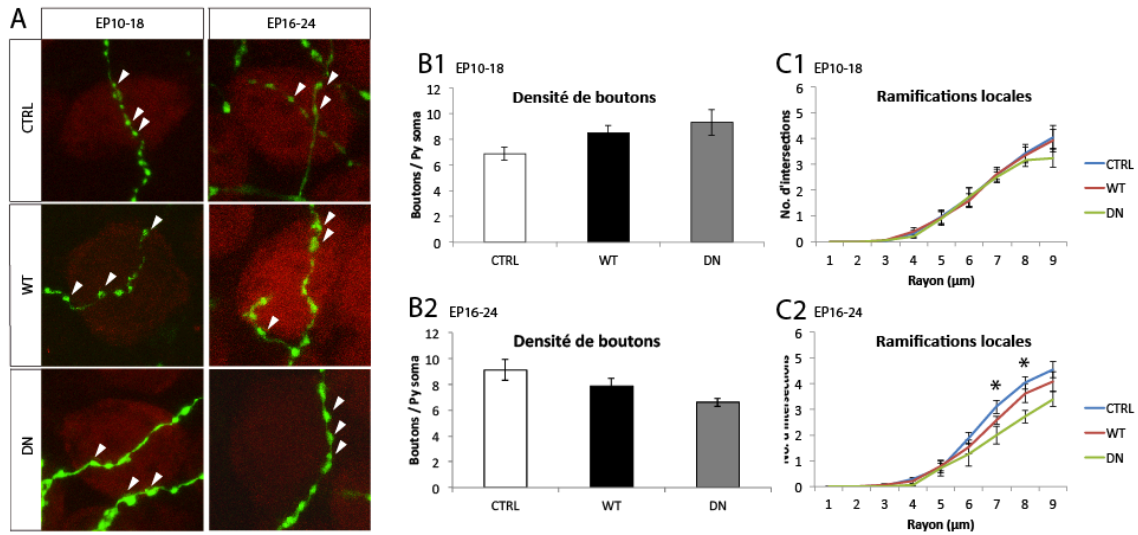


Figure 9 : Densité de boutons périsonomatiques après surexpression de la forme WT et DN de AMPK en culture organotypique. (A) Exemples de somas pyramidaux innervés par l'axone d'une cellule PV transfectée à EP10-18 ou EP16-24. (B1 et B2) Densité de boutons synaptiques à l'intérieur de 9 μm à partir du centre du soma pyramidal à EP10-18 (CTRL n=6, WT n=7, DN n=4; ANOVA à un facteur contrôlé, $P>0.05$) ou EP16-24 (CTRL n=6, WT n=6, DN n=4; ANOVA à un facteur contrôlé, $P>0.05$) (C1 et C2) Complexité de l'embranchement axonal quantifiée comme le nombre moyen de croisements entre l'axone et chaque sphère placée à intervalle croissant de 1 μm à partir du centre du soma pyramidal (sphères de Sholl) à EP EP10-18 (ANOVA à un facteur contrôlé, $P>0.05$ pour tous les rayons) et à EP16-24 (ANOVA à un facteur contrôlé; $P>0.05$ pour les rayons 1 à 6 et 9; $P<0.05$ pour les rayons 7 et 8)

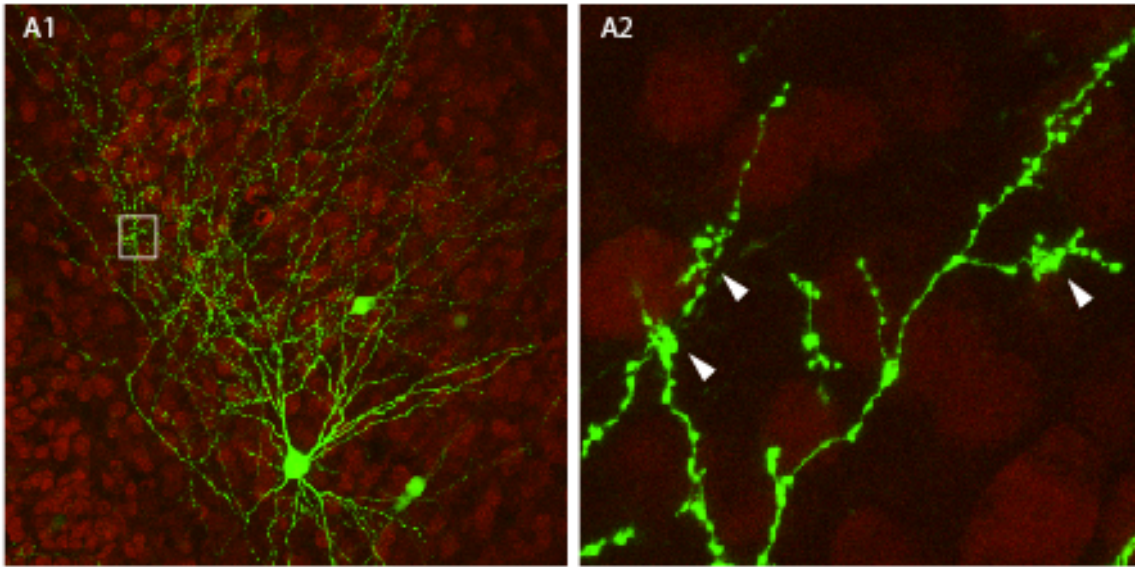


Figure 10 : Surexpression d'AMPK WT à EP 10-18 dans une cellule PV en culture organotypique. (A1) Cellule PV (zoom 20X) (A2) Agrandissement d'une section de l'axone de la cellule en A1. L'axone montre une désorganisation de la stabilité des synapses caractérisée par des boutons synaptiques de grosseur parfois anormale, des agglomérations de boutons et une grande quantité de petites protrusions.

3.3 Discussion

L'AMPK est un gardien de l'homéostasie énergétique dans les cellules et son expression est ubiquitaire. Dans les neurones, elle est particulièrement bien équipée pour 'sentir' l'activité neuronale et répondre efficacement aux changements énergétiques transitoires. Par contre, en condition pathophysiologique, il est possible que son activation soit néfaste dans des neurones en développement. Ici, nous montrons que l'activation d'AMPK dans les cellules PV du cortex, sélectivement vulnérable dans la dernière étude, modifie l'établissement de l'innervation périsonomatique d'une cellule PV sur les cellules pyramidales.

L'étude des effets d'AMPK *in vitro* est compliquée par le fait que son activation est dépendante de plusieurs facteurs physiologiques comme la concentration intracellulaire de glucose et les niveaux d'oxygène. Puisque les conditions physiologiques sont différentes des conditions en culture organotypique, nous avons prévu utiliser une forme mutée constitutivement active de la sous-unité $\alpha 2$ pour s'assurer de l'activation d'AMPK. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à introduire la mutation à temps pour faire les expériences. Par contre nous avons montré que la surexpression de la sous-unité $\alpha 2$ WT avait les conséquences fonctionnelles attendues d'une forme constitutivement active, bien que les résultats ne soit pas significatifs par le fait que le groupe du mutant DN n'est pas complet et affecte la puissance statistique. Nous ne pouvons donc pas affirmer que le groupe DN abolit efficacement l'activité endogène d'AMPK.

L'AMPK est une protéine servant de mécanisme de défense envers une déplétion énergétique cellulaire. Or, nos résultats montrent que la surexpression de la sous-unité $\alpha 2$ WT est néfaste pour l'intégrité de la maturation des cellules PV. Bien que le nombre de boutons synaptiques et les ramifications de l'axone autour des somas pyramidaux ne

semblent pas changer significativement lors de la surexpression de la sous-unité $\alpha 2$ WT pendant la phase de formation et de maturation synaptique, la phase de formation est marquée par une désorganisation de la stabilisation des synapses. Ces résultats renforcent l'hypothèse que les cellules PV sont particulièrement vulnérables à un certain moment de leur développement.

Les résultats du groupe du mutant DN (bien que non complets) impliquent qu'il est possible que l'innervation périsonotique d'une cellule PV sur les cellules pyramidales soit dépendante de l'activation d'AMPK et que cette dépendance diffère selon la phase de développement synaptique. En effet, les résultats de la surexpression de la sous-unité $\alpha 2$ mutée DN suggèrent que pendant la phase de formation synaptique, les cellules PV forment plus de boutons synaptiques autour des cellules pyramidales, alors que pendant la phase de maturation, les cellules PV forment moins de boutons synaptiques et de ramifications autour des cellules pyramidales. Des données antérieures de notre laboratoire suggèrent qu'une augmentation de l'activité neuronale dans les cellules PV accélère la maturation des synapses fait sur les cellules pyramidales environnantes. La fonction d'AMPK est grandement liée à la diminution de l'activité neuronale soit par la déphosphorylation du canal $K_v 2.1$ et la stabilisation du récepteur $GABA_B$ à la membrane. Il est donc possible que nos résultats de l'abolition de l'activité d'AMPK pendant la phase de formation synaptique soit expliqués par une augmentation l'activité neuronale des cellules PV menant à une maturation précoce des synapses. Par contre, il est possible que cet effet pendant la phase de maturation soit masqué par un autre phénomène. En effet, pendant la phase de maturation, les cellules PV deviennent plus 'performantes' i.e. qu'elles acquièrent la capacité de produire des potentiels d'action à haute fréquence. Ce phénomène demande un haut taux de renouvellement énergétique dans les cellules, et AMPK est une des protéines possiblement capable de régénérer les stocks d'énergie dans de telles conditions. Il est possible qu'une abolition de l'activité d'AMPK pendant la phase de maturation altère suffisamment le renouvellement énergétique pour retarder le développement de l'axone des cellules PV. Au meilleur de nos connaissances, le rôle

d'AMPK dans le développement neuronal en situation physiologique n'a jamais été rapporté au par avant. Plus de travail sera nécessaire pour compléter ces expériences et vérifier ces résultats.

4. Conclusion

La neurotransmission GABAergique joue plusieurs rôles dans le cerveau, depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte des interneurones, et une dysfonction des interneurones a été associée à plusieurs troubles neurologiques, comme la schizophrénie, l'autisme et l'épilepsie. La maturation des circuits GABAergiques se fait majoritairement pendant la période post-natale et est hautement dépendante de l'activité neuronale et de l'expérience sensorielle. Nos résultats révèlent que le lourd fardeau en demande énergétique d'une insulte asphyxique périnatale peut causer une mort neuronale sélective des cellules PV et compromettre l'intégrité de leur maturation. Un des mécanismes sous-jacents possible à cette immaturité des cellules PV suite à l'insulte hypoxique est l'activation d'AMPK, en désorganisant leur profil d'innervation sur les cellules pyramidales. Nous pensons que ces changements dans le réseau GABAergique pourraient contribuer aux problèmes neurologiques associés à une insulte hypoxique.

5. Bibliographie

- 1 Kurinczuk, J. J., White-Koning, M. & Badawi, N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early human development* **86**, 329-338, doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010 (2010).
- 2 Force, A. M. f. t. I. C. P. T. A template for defining a causal relation between acute intrapartum events and cerebral palsy: international consensus statement. *BMJ* **319**, 1054–1059 (1999).
- 3 Dammann, O., Donna, Ferriero & Gressens, P. Neonatal Encephalopathy or Hypoxic-Ischemic Encephalopathy? Appropriate Terminology Matters. *Pediatr res* **70**, 1-2 (2011).
- 4 Hankins, G. D. V. & Speer, M. Defining the Pathogenesis and Pathophysiology of Neonatal Encephalopathy and Cerebral Palsy. *The American College of Obstetricians and Gynecologists* **102**, 628-636 (2003).
- 5 Robertson, C. M. & Perlman, M. Follow-up of the term infant after hypoxic-ischemic encephalopathy. *Paediatr Child Health* **11**, 278-282 (2006).
- 6 Korst, L. M., Phelan, J. P., Wang, Y. M., Martinan, G. I. & Ahn, M. O. Acute Fetal Asphyxia and Permanent Brain Injury: A Retrospective Analysis of Current Indicators. *The journal of Maternal-Fetal Medecine* **8**, 101–106 (1999).
- 7 Kumar, S. & Paterson-Brown, S. Obstetric aspects of hypoxic ischemic encephalopathy. *Early human development* **86**, 339-344, doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.05.009 (2010).
- 8 van Handel, M., Swaab, H., de Vries, L. S. & Jongmans, M. J. Behavioral outcome in children with a history of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia. *Journal of pediatric psychology* **35**, 286-295, doi:10.1093/jpepsy/jsp049 (2010).
- 9 Gonzalez, F. F. & Miller, S. P. Does perinatal asphyxia impair cognitive function without cerebral palsy? *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* **91**, F454-459, doi:10.1136/adc.2005.092445 (2006).
- 10 Haan, M. d. *et al.* Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. *Developmental Science* **9**, 350–358 (2006).
- 11 Mary Cannon, Peter B. Jones & Robin M. Murray. Obstetric Complications and Schizophrenia- Historical and Meta-Analytic Review. *The American journal of psychiatry* **159**, 1080–1092 (2002).
- 12 Inder, T. E. & Volpe, J. J. Mechanisms of perinatal brain injury. *Seminars in neonatology : SN* **5**, 3-16, doi:10.1053/siny.1999.0112 (2000).
- 13 Berger, R. & Garnier, Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain research*, 107-134 (1999).

- 14 Roohey, T., Raju, T. N. K. & Moustogiannis, A. N. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early human development* **47**, 115-146 (1997).
- 15 Rice, J., Vannucc, R. & Brierley, J. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of neurology* **9**, 131-141 (1981).
- 16 Vannucci, S. J. & Hagberg, H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *The Journal of experimental biology* **207**, 3149-3154, doi:10.1242/jeb.01064 (2004).
- 17 Rakhade, S. N. & Jensen, F. E. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nature reviews. Neurology* **5**, 380-391, doi:10.1038/nrneurol.2009.80 (2009).
- 18 Ben-Ari, Y. & Holmes, G. L. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *The Lancet Neurology* **5**, 1055-1063, doi:10.1016/s1474-4422(06)70626-3 (2006).
- 19 Thibeault-Eybalin, M. P., Lortie, A. & Carmant, L. Neonatal seizures: do they damage the brain? *Pediatric neurology* **40**, 175-180, doi:10.1016/j.pediatrneurol.2008.10.026 (2009).
- 20 HOLMES, G. L. & BEN-ARI, Y. The Neurobiology and Consequences of Epilepsy in the Developing Brain. *pediatr res* **49**, 320-325 (2001).
- 21 WIRRELL, E. C., ARMSTRONG, E. A., OSMAN, L. D. & YAGER, J. Y. Prolonged Seizures Exacerbate Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Pediatr res* **50** (2001).
- 22 Goldberg, E. M. & Coulter, D. A. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nature reviews. Neuroscience* **14**, 337-349, doi:10.1038/nrn3482 (2013).
- 23 Rakhade, S. N. *et al.* Development of later life spontaneous seizures in a rodent model of hypoxia-induced neonatal seizures. *Epilepsia* **52**, 753-765, doi:10.1111/j.1528-1167.2011.02992.x (2011).
- 24 Arber, C. & Li, M. Cortical interneurons from human pluripotent stem cells: prospects for neurological and psychiatric disease. *Frontiers in cellular neuroscience* **7**, 10, doi:10.3389/fncel.2013.00010 (2013).
- 25 Markram, H. *et al.* Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews. Neuroscience* **5**, 793-807, doi:10.1038/nrn1519 (2004).
- 26 Isaacson, J. S. & Scanziani, M. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron* **72**, 231-243, doi:10.1016/j.neuron.2011.09.027 (2011).
- 27 McBain, C. J. & Fisahn, A. Interneurons unbound. *Nature Review Neuroscience* **2**, 11-23 (2001).
- 28 Ascoli GA *et al.* Petilla terminology- nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature Review Neuroscience* **9**, 557-568 (2008).

- 29 Rudy, B., Fishell, G., Lee, S. & Hjerling-Leffler, J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Developmental neurobiology* **71**, 45-61, doi:10.1002/dneu.20853 (2011).
- 30 Wonders, C. P. & Anderson, S. A. The origin and specification of cortical interneurons. *Nature reviews. Neuroscience* **7**, 687-696, doi:10.1038/nrn1954 (2006).
- 31 Marín, O. & Rubenstein, J. L. R. A Long, Remarkable Journey: Tangential Migration in the Telencephalon. *Nature reviews. Neuroscience* **2**, 780-790 (2001).
- 32 Huang, Z. J., Di Cristo, G. & Ango, F. Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 673-686, doi:10.1038/nrn2188 (2007).
- 33 Jovanovic, J. N. & Thomson, A. M. Development of cortical GABAergic innervation. *Frontiers in cellular neuroscience* **5**, 14, doi:10.3389/fncel.2011.00014 (2011).
- 34 Le Magueresse, C. & Monyer, H. GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. *Neuron* **77**, 388-405, doi:10.1016/j.neuron.2013.01.011 (2013).
- 35 Lewis, D. A., Curley, A. A., Glausier, J. R. & Volk, D. W. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in neurosciences* **35**, 57-67, doi:10.1016/j.tins.2011.10.004 (2012).
- 36 Bernard, C., Cossart, R., Hirsch, M., Esclapez, M. & Ben-Ari, Y. What is GABAergic Inhibition? How Is it Modified in Epilepsy? *Epilepsia* **6**, s90-s95 (2000).
- 37 Cossart, R., Bernard, C. & Ben-Ari, Y. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends in neurosciences* **28**, 108-115, doi:10.1016/j.tins.2004.11.011 (2005).
- 38 Steinberg, G. R. & Kemp, B. E. AMPK in Health and Disease. *Physiological reviews* **89**, 1025-1078, doi:10.1152/physrev.00011.2008 (2009).
- 39 Xiao, B. *et al.* Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* **472**, 230-233, doi:10.1038/nature09932 (2011).
- 40 Young, L. H. AMP-activated protein kinase conducts the ischemic stress response orchestra. *Circulation* **117**, 832-840, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.713115 (2008).
- 41 Ramamurthy, S. & Ronnett, G. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and Energy-Sensing in the Brain. *Experimental neurobiology* **21**, 52-60, doi:10.5607/en.2012.21.2.52 (2012).
- 42 Amato, S. & Man, H. Y. Bioenergy sensing in the brain: the role of AMP-activated protein kinase in neuronal metabolism, development and neurological diseases. *Cell Cycle* **10**, 3452-3460, doi:10.4161/cc.10.20.17953 (2011).

- 43 Inoki, K., Kim, J. & Guan, K. L. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annual review of pharmacology and toxicology* **52**, 381-400, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134537 (2012).
- 44 Ikematsua, N. *et al.* Phosphorylation of the voltage-gated potassium channel Kv2.1 by AMP-activated protein kinase regulates membrane excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**, 18132-18137 (2011).
- 45 Terunuma, M., Pangalos, M. N. & Moss, S. J. Functional Modulation of GABAB Receptors by Protein Kinases and Receptor Trafficking. **58**, 113-122, doi:10.1016/s1054-3589(10)58005-0 (2010).
- 46 Carling, D., Mayer, F. V., Sanders, M. J. & Gamblin, S. J. AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nat Chem Bio* **7**, 512-518 (2011).
- 47 Dasgupta, B. & Milbrandt, J. AMP-activated protein kinase phosphorylates retinoblastoma protein to control mammalian brain development. *Developmental cell* **16**, 256-270, doi:10.1016/j.devcel.2009.01.005 (2009).
- 48 Williams, T., Curchet, J., Viollet, B., Brenman, J. E. & Polleux, F. AMP-activated protein kinase (AMPK) activity is not required for neuronal development but regulates axogenesis during metabolic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 5849-5854, doi:10.1073/pnas.1013660108 (2011).
- 49 Amato, S. *et al.* AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization. *Science* **332**, 247-251, doi:10.1126/science.1201678 (2011).
- 50 Chattopadhyaya, B. & Cristo, G. D. GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders. *Frontiers in psychiatry / Frontiers Research Foundation* **3**, 51, doi:10.3389/fpsy.2012.00051 (2012).