

Université de Montréal

**Modulation cholinergique de l'activité épileptiforme  
dans le cortex de rat et conséquences à long terme de  
crises précoces expérimentales dans l'hippocampe et le  
cortex de rat**

par

Soizic Potier

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en Sciences neurologiques

Décembre 2004

© Soizic Potier, 2004



W

4

U58

2005

v.085

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Modulation cholinergique de l'activité épileptiforme dans le cortex de rat et conséquences  
à long terme de crises précoces expérimentales dans l'hippocampe et le cortex de rat

présentée par :  
Soizic Potier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Vincent Castellucci, président-rapporteur  
Dr Caterina Psarropoulou, directeur de recherche  
Dr Laurent Descarries, co-directeur  
Dr Richard Warren, membre du jury  
Dr Mircea Steriade, examinateur externe



## Résumé

Les travaux de cette thèse avaient pour but d'analyser les mécanismes de modulation cholinergique de l'activité épileptiforme dans le néocortex du rat immature et les conséquences à long terme de crises expérimentales précoces sur les propriétés fonctionnelles des récepteurs muscariniques (mAChR) dans l'hippocampe et le néocortex du rat adulte.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des enregistrements extracellulaires de l'activité épileptiforme induite par une levée de l'inhibition GABAergique, dans des tranches de néocortex de rat immature. Nous avons également examiné les effets d'un inhibiteur de l'acétylcholinestérase sur les décharges synchrones spontanées et les potentiels de champs évoqués par stimulation électrique. Les observations électrophysiologiques suggèrent un effet cholinergique inhibiteur sur les potentiels épileptiformes évoqués, associé à un effet excitateur sur les décharges synchrones spontanées dans le néocortex de rat immature, ces deux effets étant médiés par les mAChR. L'effet inhibiteur étant un improbable candidat comme mécanisme de cessation des crises, ces données mettent en exergue le rôle de premier plan de l'ACh endogène en tant qu'agent facilitateur de l'épileptogenèse dans le néocortex immature (*Neuroscience Letters*, 2001).

Dans un deuxième temps, nous avons approfondi l'étude de cette facilitation cholinergique de l'activité épileptiforme dans le néocortex de rat immature. Une autre série d'enregistrements extracellulaires, menée sur des tranches néocorticales de rat immature maintenues en condition de désinhibition, nous a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant des mAChR M1 dans la facilitation de décharges épileptiformes glutamatergiques. En effet, nous avons démontré une abolition des décharges synchrones spontanées en présence d'un antagoniste sélectif de ce sous-type récepteuriel, la pirenzepine, ou lors du blocage de la relâche calcique intracellulaire. De plus, les décharges épileptiformes spontanées sont apparues soumises à une modulation selon le degré d'ouverture des jonctions électriques, tel que mis en évidence à la suite du blocage de ces jonctions par l'halothane et la carbenoxolone (*Brain Research*, 2004)

Dans un dernier temps, nous avons examiné les conséquences d'une crise généralisée, induite à vingt jours postnataux par le pentylenetetrazole (PTZ), sur l'affinité et la densité des mAChR, leur niveau d'expression et leur efficacité de couplage aux protéines G dans le néocortex et l'hippocampe du rat adulte. Des études antérieures du laboratoire avaient en effet relevé une hyperexcitabilité cholinergique à long terme, médiée par les récepteurs muscariniques, dans des tranches d'hippocampe provenant de rats ayant subi une telle crise, sans modification apparente de la densité d'innervation cholinergique, de l'inhibition GABAergique, ou du contenu hippocampal en ACh ou GABA à l'âge adulte (Meilleur *et al.*, 2003). Nous avons donc recherché d'éventuels changements pathophysiologiques affectant les mAChR par autoradiographie de liaison, hybridation *in situ* et la méthode du [<sup>35</sup>S]GTPγS. Cette étude n'a montré aucun changement de la densité de radioliasion aux mAChR M1 et M2, ni de l'expression des récepteurs de type m1, m2 et m3 dans le néocortex et l'hippocampe de rats PTZ comparativement aux témoins. En revanche, la méthode du [<sup>35</sup>S]GTPγS a mis en évidence, dans ces deux régions cérébrales, une augmentation hautement significative de l'efficacité de couplage aux protéines G chez les rats PTZ, lors de l'activation par l'ACh et l'oxotremorine. Cette augmentation à long terme semble imputable au sous-type récepteuriel M1 et peut rendre compte de l'hyperexcitabilité cholinergique observée à long terme, suite à une crise PTZ précoce. Au regard des résultats électrophysiologiques précédents, on peut y voir une explication possible pour la survenue de crises chez l'adulte, par suite d'une crise épileptique généralisée durant l'enfance (Soumis à *European Journal of Neuroscience*, 2004).

**Mots-clés :** Epileptogenèse, acétylcholine, récepteurs muscariniques, développement, jonctions électriques, conséquences pathophysiologiques.

## Abstract

The aim of this thesis was to analyze the mechanisms of cholinergic modulation of epileptiform activity in immature rat neocortex and the long term consequences of early experimental seizures on the functional properties of muscarinic receptors (mAChR) in adult rat hippocampus and neocortex.

First, we carried out extracellular recordings of the epileptiform activity induced by GABAergic disinhibition in immature rat neocortical slices. We also examined the effects of the acetylcholinesterase inhibitor eserine on synchronous spontaneous discharges and field potential evoked by electrical stimulation. The electrophysiological observations suggest an inhibitory cholinergic effect on evoked field potentials, associated with an excitatory effect on spontaneous discharges, both of which appear to be mediated by mAChR. As the inhibitory effect is unlikely to account for termination of the seizures, these data highlight the role of endogenous ACh as a facilitatory agent of epileptogenesis in immature rat neocortex (*Neuroscience Letters*, 2001).

Second, we further investigated this cholinergic facilitation of epileptiform activity in immature rat neocortex. Again, extracellular recordings were performed in disinhibited neocortical slices from immature rat. The results demonstrated a primary role for M1 mAChR in muscarinic facilitation of glutamatergic epileptiform discharges, as shown by the abolition of spontaneous discharges in the presence of the M1 antagonist pirenzepine, or of blockers of release from intracellular calcium stores. Furthermore, blockade of gap junctions with halothane or carbenoxolone indicated that the degree of opening of these electrical junctions could modulate the spontaneous epileptiform discharges (*Brain Research*, 2004).

Lastly, we examined the consequences of a generalized seizure, induced by pentylenetetrazole (PTZ) at twenty days postnatally, on the density and affinity of mAChR, on their level of expression and on their coupling efficacy in adult rat hippocampus and neocortex. Earlier studies from our laboratory had demonstrated a long-term cholinergic hyperexcitability in hippocampal slices from adult PTZ rats, without any apparent modification of the density of cholinergic innervation, of the GABAergic inhibition, nor of

the ACh and GABA contents of the adult hippocampus (Meilleur *et al.*, 2003). We therefore searched for possible pathophysiological changes of mAChRs by binding autoradiography, *in situ* hybridization and the [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S method. This study did not show any change in density of M1 and M2 binding sites, nor in level m1-m3 mRNA in the hippocampus and neocortex of treated rats compared to controls. In contrast, the [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S assay revealed a strongly significant increase in the efficacy of mAChR coupling to G-protein, upon activation by ACh or oxotremorine. This long term increase appears to be imputable to M1 receptors and could account for the cholinergic hyperexcitability observed at long time intervals after an early seizure. In the light of the earlier electrophysiological results, it may provide an explanation for the late occurrence of epilepsy in adult following severe generalized seizures in infancy (submitted to *European Journal of Neuroscience*, 2004).

**Keywords** : Epileptogenesis, acetylcholine, muscarinic receptors, development, gap junctions, pathophysiological consequences



# Table des matières

|   |          |
|---|----------|
| Résumé.....   | iii      |
| Abstract.....   | v        |
| Table des matières.....   | vii      |
| Liste des tableaux.....   | xii      |
| Liste des figures.....  | xiii     |
| Liste des abréviations.....   | xvi      |
| Remerciements.....  | xxii     |
| <br>  |          |
| <b>Chapitre I</b>   |          |
| <b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>   | <b>1</b> |
| <b>I.1 PRÉSENTATION DE LA THÈSE .....</b>                                 | <b>2</b> |
| <b>I.2 L'ÉPILEPSIE .....</b>  | <b>3</b> |
| I.2.1 Brève histoire de l'épilepsie.....                                  | 4        |
| I.2.2 Classification des crises épileptiques.....                         | 5        |
| <b>I.3 L'HIPPOCAMPE ET L'ÉPILEPTOGENÈSE.....</b>                          | <b>7</b> |
| I.3.1 Généralités.....  | 7        |
| I.3.2 Organisation générale de l'hippocampe.....                          | 8        |
| I.3.3 Composition cellulaire de l'hippocampe.....                         | 11       |
| I.3.4 Les interconnexions de l'hippocampe : le circuit trisynaptique..... | 13       |

|  |    |
|--|----|
| <b>I.4 LE NÉOCORTEX ET L'ÉPILEPTOGENÈSE</b> .....                                | 14 |
| I.4.1 Organisation générale du néocortex.....                                    | 14 |
| I.4.2 Contribution du néocortex à l'épileptogenèse.....                          | 19 |
| <b>I.5 LES MÉCANISMES CELLULAIRES ÉPILEPTOGÈNES</b> .....                        | 22 |
| I.5.1 Electrophysiologie de l'activité épileptique.....                          | 22 |
| I.5.2 Les mécanismes de génération des crises.....                               | 25 |
| I.5.2.1 La transmission excitatrice glutamatergique et l'épileptogenèse.....     | 26 |
| I.5.2.2 La transmission inhibitrice GABAergique et l'épileptogenèse.....         | 27 |
| I.5.2.3 Les neuromodulateurs et l'épileptogenèse.....                            | 28 |
| I.5.3 Les mécanismes de propagation des crises.....                              | 29 |
| I.5.4 Contribution des jonctions électriques et facteurs<br>non-synaptiques..... | 31 |
| I.5.4.1 Les jonctions électriques et l'épileptogenèse.....                       | 31 |
| I.5.4.2 La communication éphaptique et l'épileptogenèse.....                     | 34 |
| I.5.4.3 La pression osmotique et l'épileptogenèse.....                           | 34 |
| I.5.4.4 Le pH et l'épileptogenèse.....   | 35 |
| I.5.5 La composante développementale.....  | 35 |
| <b>I.6 L'ACÉTYLCHOLINE DANS LE CORTEX CÉRÉBRAL<br/>ET L'HIPPOCAMPE</b> .....     | 38 |
| I.6.1 L'innervation cholinergique dans le cortex cérébral adulte.....            | 38 |
| I.6.2 L'innervation cholinergique dans l'hippocampe adulte.....                  | 40 |
| I.6.3 Développement ontogénique de l'innervation cholinergique<br>cérébrale..... | 41 |

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| I.6.4   | Les récepteurs cholinergiques : distribution corticale et hippocampale..... | 42        |
| I.6.4.1   | Les récepteurs nicotiniques.....  | 43        |
| I.6.4.1   | Les récepteurs muscariniques.....   | 44        |
| I.6.5   | Les mécanismes d'action biochimiques des récepteurs muscariniques.....      | 48        |
| I.6.5.1   | L'activation des récepteurs muscariniques M1, M3 et M5.....                 | 51        |
| I.6.5.2   | L'activation des récepteurs muscariniques M2 et M4.....                     | 52        |
| I.6.6   | Les effets de l'activation muscarinique dans le cortex et l'hippocampe..... | 53        |
| I.6.7   | La régulation des récepteurs muscariniques.....                             | 55        |
| I.6.8   | Acétylcholine et épilepsie.....   | 57        |
| <b>I.7 LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX DE CRISES .....</b>  |   | <b>60</b> |
| I.7.1   | Les différents modèles animaux de crises épileptiques <i>in vivo</i> .....  | 60        |
| I.7.2   | Les modèles d'activité épileptique sur tranches.....                        | 64        |
| <b>I.8 OBJECTIFS DE RECHERCHE.....</b>                |   | <b>66</b> |
| <br><b>Chapitre II</b>                                |   |           |
| <b>ENDOGENOUS ACETYLCHOLINE FACILITATES</b>           |   |           |
| <b>EPILEPTOGENESIS IN IMMATURE RAT NEOCORTEX.....</b> |   | <b>67</b> |

### **Chapitre III**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>MODULATION OF MUSCARINIC FACILITATION OF<br/>EPILEPTIFORM DISCHARGES IN IMMATURE RAT<br/>NEOCORTEX .....</b> | <b>85</b> |
|---|-----------|

### **Chapitre IV**

|   |            |
|---|------------|
| <b>A PENTYLENETETRAZOLE - INDUCED GENERALIZED<br/>SEIZURE IN EARLY LIFE ENHANCES THE EFFICACY<br/>OF MUSCARINIC RECEPTOR COUPLING TO G-PROTEIN<br/>IN HIPPOCAMPUS AND NEOCORTEX OF ADULT RAT.....</b> | <b>128</b> |
|---|------------|

### **Chapitre V**

|  |            |
|--|------------|
| <b>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>  | <b>166</b> |
| <b>V.1 TECHNIQUES ET MODÈLES EXPÉRIMENTAUX.....</b>  | <b>167</b> |
| V.1.1 Enregistrements électrophysiologiques.....   | 167        |
| V.1.2 Le choix du modèle de crises induites par le<br>pentylentetrazole.....                           | 169        |
| V.1.3 Quantification autoradiographique des récepteurs<br>muscariniques corticaux et hippocampaux..... | 171        |
| V.1.4 Quantification du niveau d'expression des récepteurs<br>muscariniques.....                       | 172        |
| V.1.5 Quantification du niveau de couplage des récepteurs  |            |

|  |            |
|--|------------|
| muscariniques aux protéines G.....                             | 173        |
| <b>V.2 EFFET FACILITATEUR DE L'ACÉTYLCHOLINE</b>               |            |
| <b>SUR L'ÉPILEPTOGENÈSE DANS LE NÉOCORTEX</b>                  |            |
| <b>DE RAT IMMATURE.....</b>                                    | <b>174</b> |
| V.2.1     Rappel des principaux résultats .....                | 174        |
| V.2.2     Implications fonctionnelles .....                    | 175        |
| <b>V.3 LA MODULATION DE LA FACILITATION</b>                    |            |
| <b>MUSCARINIQUE DES DÉCHARGES ÉPILEPTIFORMES</b>               |            |
| <b>DANS LE NÉOCORTEX DE RAT IMMATURE.....</b>                  | <b>176</b> |
| V.3.1     Rappel des principaux résultats.....                 | 176        |
| V.3.2     Implications fonctionnelles et neurobiologiques..... | 177        |
| <b>V.4 L'INDUCTION PRÉCOCE D'UNE CRISE GÉNÉRALISÉE</b>         |            |
| <b>PAR LE PENTYLENETETRAZOLE AUGMENTE À LONG</b>               |            |
| <b>TERME L'EFFICACITÉ DU COUPLAGE DES RÉCEPTEURS</b>           |            |
| <b>MUSCARINIQUES AUX PROTÉINES G.....</b>                      | <b>180</b> |
| V.4.1     Rappel des principaux résultats.....                 | 180        |
| V.4.2     Implications fonctionnelles et neurobiologiques..... | 181        |
| <b>V.5 EN GUISE DE CONCLUSION.....</b>                         | <b>183</b> |
| <br><b>Chapitre VI</b>   |            |
| <b>BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE.....</b>                             | <b>185</b> |

## Liste des tableaux

### Chapitre IV

- Table 1.** Autoradiographic measurement of [<sup>3</sup>H]pirenzepine and [<sup>3</sup>H]AFDX-384 binding in the neocortex and hippocampus (CA1, CA3) of control and PTZ-treated rats.....159
- Table 2.** *In situ* hybridization measurement of m1, m2 and m3 receptor mRNA in the neocortex (Cg, Par 1) and hippocampus (Pyr, Gr) of control and PTZ-treated rats.....160
- Table 3.** Agonist – stimulated [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation in the neocortex (Cg, Par 1) and hippocampus (CA1, CA3) of control and PTZ-treated rats.....161
- Table 4.** Blockade by atropine of the oxotremorine stimulation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation in the neocortex (Cg and Par1) and hippocampus (CA1 and CA3) of control and PTZ-treated rats.....162

## Liste des figures

### Chapitre I

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Structure interne de l'hippocampe de rat .....   | 10 |
| <b>Figure 2</b> : Coupes histologiques du néocortex colorées avec les méthodes<br>de Golgi, Nissl et Weigert .....   | 17 |
| <b>Figure 3</b> : Distribution corticale laminaire des différents types de<br>neurones.....  | 18 |
| <b>Figure 4</b> : Diagramme schématique des relations entre décharges<br>corticales et activités intra- et extracellulaires dans un<br>foyer épileptique ..... | 21 |
| <b>Figure 5</b> : Cascades intracellulaires suite à l'activation des récepteurs<br>muscariniques M1, M3 et M5 (A) ou M2 et M4 (B).....                         | 50 |

### Chapitre II

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Inhibitory effect of eserine on the evoked potentials recorded<br>from a P13 rat cortical slice..... | 81 |
| <b>Figure 2</b> : Reversal of the effects of eserine by the muscarinic antagonist<br>atropine.....                     | 82 |
| <b>Figure 3</b> : Induction of ictal-like discharges by eserine in a P26<br>slice.....                                 | 83 |

### Chapitre III

- Figure 1 :** Excitatory evoked field potentials recorded from immature neocortical slices in the presence of bicuculline.....120
- Figure 2:** Effects of the glutamate receptor antagonists on the evoked excitatory field potentials recorded in BMI or in BMI and CCh .....121
- Figure 3 :** Reversal of cholinergic depression of evoked excitatory field potentials by a muscarinic but not a nicotinic antagonist.....122
- Figure 4:** Cholinergic effects on the frequency of the BMI-induced spontaneous field potentials.....123
- Figure 5:** Samples of ictal- and interictal-like discharges in BMI and changes in their rates following addition of eserine or carbachol.....124
- Figure 6:** Effects of the NMDA and non-NMDA glutamate receptor antagonists AP5 and CNQX on the frequency of spontaneous discharges recorded in BMI and CCh.....125
- Figure 7:** Effects of high  $\text{Ca}^{2+}$  ACSF and of gap junction blockers on the frequency of spontaneous field potentials in BMI and CCh.....126



**Chapitre IV**

- Figure 1.** Color-coded autoradiographs illustrating the basal and agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS incorporation in the cerebral cortex and hippocampus of control and PTZ-treated rats.....163
- Figure 2.** Graph illustrating the basal and oxotremorine-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS incorporation in the cerebral cortex and hippocampus of female versus male control and PTZ-treated rats.....164

## Liste des abréviations

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| 3-MPA                            | Acide 3-mercaptopropionique   |
| 4-DAMP                           | 4-piperidinyl diphenylacetate   |
| Ac                               | Anticorps   |
| AC                               | Adenylate cyclase   |
| ACII                             | Anhydrase carbonique II   |
| ACh                              | Acétylcholine   |
| AChE                             | Acétylcholinesterase  |
| ACSF                             | Liquide cérébro-spinal artificiel   |
| AFDX                             | 11-[[2-[(Diethylamino)methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido[2,3-b][1,4]benzodiazepin-6-one |
| AMPc                             | Adenosine monophosphate cyclique  |
| AP5                              | Amino-5-phosphonopentanoic acid   |
| ATPase                           | Adenosine triphosphatase  |
| BMI                              | Bicuculline methiodide  |
| [ <sup>14</sup> C]               | Isotope du carbone de masse atomique 14, naturellement radioactif   |
| CA                               | <i>Cornus Ammonis</i>   |
| Ca <sup>++</sup>                 | Ion calcique  |
| [Ca <sup>++</sup> ] <sub>i</sub> | Concentration calcique intracellulaire  |
| CCh                              | Carbamylocholine chloride   |
| CD <sub>50</sub>                 | Dose induisant des crises chez 50% des sujets   |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| cDNA                             | Acide desoxyribonucleique complémentaire  |
| ChAT                             | Choline Acétyltransférase   |
| Cg                               | Cortex cingulaire   |
| Ci                               | Curie   |
| Cl <sup>-</sup>                  | Ion chlore  |
| CNQX                             | 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3   |
| Cx                               | Connexine   |
| Da                               | Daltons   |
| DAG                              | Diacyl glycérol   |
| DC                               | Courant continu   |
| EDTA                             | Acide éthylènediamine tétra-acétique  |
| EEG                              | Électroencéphalogramme  |
| EPSP                             | Potentiel post-synaptique excitateur  |
| E-N                              | Âge embryonnaire N  |
| GABA                             | Acide $\gamma$ -amino butyrique   |
| GAERS                            | Rats génétiquement épileptiques de Strasbourg   |
| GDP                              | Guanosine diphosphate   |
| GIRK                             | Canaux potassiques rectifiants entrants   |
| GPCR                             | Récepteurs couplés aux protéines G  |
| Gr                               | Couche granulaire   |
| GRK                              | Kinase des récepteurs aux protéines G   |
| [ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S | Guanosine triphosphate, marqué avec le soufre de radioisotope 35 sur la sous unité $\gamma$ |
| [ <sup>3</sup> H]                | Hydrogène tritié  |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| HPLC                         | Chromatographie liquide à haute performance                              |
| HVA                          | Courant calcique activé à haut voltage                                   |
| HXM                          | Hexamethonium chloride   |
| Hz                           | Hertz  |
| IP                           | Intrapéritonéal  |
| IP <sub>3</sub>              | Inositol triphosphate  |
| IPSP                         | Potentiel post-synaptique inhibiteur                                     |
| IV                           | Intraveineux   |
| JC                           | Jésus-Christ   |
| K <sup>+</sup>               | Ion potassium  |
| K <sup>+</sup> <sub>IR</sub> | Canaux potassiques rectifiants entrants                                  |
| K <sup>+</sup> <sub>M</sub>  | Courant potassique non inactive et lié au voltage                        |
| KA                           | Acide kaïnique   |
| kb                           | Kilobases  |
| KO                           | Knock-out, modèle animal génétique chez lequel un gène n'est pas exprimé |
| LVA                          | Courant calcique activé à bas voltage                                    |
| M                            | Molaire, moles/L.  |
| mAChR                        | Récepteur muscarinique   |
| mGluR                        | Récepteur glutamatergique métabotropique                                 |
| mRNA                         | Acide ribonucléique messenger  |
| Na <sup>+</sup>              | Ion sodium   |
| nAChR                        | Récepteur nicotinique  |
| NMDA                         | N-methyl-D- aspartate  |

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| OD                                   | Densité optique  |
| P-N                                  | Âge postnatal N  |
| PA                                   | Potentiel d'action   |
| Par                                  | Cortex pariétal  |
| PDS                                  | Mouvement de dépolarisation paroxysmique   |
| PIP <sub>2</sub>                     | Phosphatidyl inositol diphosphate  |
| PKA                                  | Protéine kinase A  |
| PKC                                  | Protéine kinase C  |
| PLA                                  | Phospholipase A  |
| PLC                                  | Phospholipase C  |
| PLD                                  | Phospholipase D  |
| PP                                   | Voies perforantes  |
| PTX                                  | Picrotoxine  |
| PTZ                                  | Pentylentetrazole  |
| Pyr                                  | Couche pyramidale  |
| RNA                                  | Acide ribonucléique  |
| RNase                                | Ribonucléase   |
| SEM                                  | Erreur moyenne standard  |
| sm                                   | <i>Stratum moleculare</i> ; couche moléculaire   |
| SNC                                  | Système nerveux central  |
| so                                   | <i>Stratum oriens</i>  |
| TLE                                  | Épilepsie du lobe temporal   |
| [ <sup>35</sup> S]UTP <sub>γ</sub> S | Uridyne triphosphate, marqué avec le soufre de radioisotope<br>35 sur la sous unité $\gamma$ |

VIP

Polypeptide intestinal vasoactif

$V_M$

Potentiel de repos membranaire

*À mes parents et à Matthieu,  
Phares de toutes mes tempêtes...*

## Remerciements

Un certain nombre de personnes m'ont accompagnée, de près ou de loin, et épaulée durant ces quatre années de doctorat; je les en remercie de tout cœur.

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, le Dr Caterina Psarropoulou, pour la confiance qu'elle m'a témoignée tout au long de mon doctorat. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère gratitude pour sa patience et la qualité des enseignements et conseils qu'elle m'a prodigués.

J'aimerais également remercier mon codirecteur de recherche, le Dr Laurent Descarries, pour sa disponibilité, ses conseils éclairés et son aide inestimable.

Merci également au Dr Vincent Castellucci pour sa gentillesse, ses nombreux conseils et pour avoir toujours su trouver la solution.

Je remercie les membres de mon jury qui ont généreusement accepté d'évaluer cette thèse.

Merci à Delphine, Séverine, Déborah, Berline, Sébastien et Mark pour leur amitié, leur sens de l'humour et leur initiation à la culture québécoise dès mon arrivée...

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance sans borne à mes parents, pour leur soutien et leurs encouragements permanents; cette thèse est un peu la vôtre...

Enfin, je souhaiterais remercier mon conjoint, Matthieu, pour son amour, sa patience, son soutien, sa compréhension infinie, le bonheur incommensurable qu'il m'apporte...et pour avoir perdu un nombre d'heures incalculable à résoudre mes problèmes informatiques et à mettre au point certaines des figures.

Merci à tous,



## **Chapitre I**

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## I.1 PRÉSENTATION DE LA THÈSE

Cette thèse comprend six chapitres. Le premier est une présentation générale de la thèse et du contexte dans lequel elle s'est située. Ainsi, après un rapide survol de la pathologie épileptique, des régions impliquées dans ce dérèglement du fonctionnement cérébral et des mécanismes cellulaires sous-jacents, divers modèles expérimentaux permettant l'étude de la condition épileptique *in vivo* et *in vitro* sont présentés. Enfin, un exposé plus détaillé de l'état des connaissances actuelles sur l'innervation cholinergique du néocortex et de l'hippocampe pourra servir de base à l'analyse de l'implication de l'acétylcholine dans les mécanismes épileptogènes, au vu des résultats de nos travaux. Il sera notamment fait mention des variations cholinergiques intervenant au cours du développement cérébral, une donnée particulièrement pertinente lors de l'étude des mécanismes de l'épileptogenèse, l'incidence de ce trouble étant significativement plus élevée durant l'enfance qu'à l'âge adulte. Les objectifs et la mise en perspective des recherches seront ensuite développés.

Les trois chapitres suivants se présentent sous la forme d'articles de recherche originaux, rédigés comme premier auteur et dont les deux premiers sont déjà parus. Ils sont suivis d'une discussion générale, qui revoit les principales conclusions de ce projet tirées de nos résultats et les perspectives d'avenir qu'ils entrouvrent. Enfin une bibliographie générale répertorie les références citées dans l'Introduction et la Discussion Générales.

## I.2 L'ÉPILEPSIE

Longtemps associée à d'autres troubles moteurs avec dysfonctionnements cognitifs sévères sous la notion générique "d'idiotie", l'épilepsie désigne, étymologiquement parlant, une "prise par surprise" (venant du grec " επιλαμβάνειν", *epilambanein*). Ce trouble physique est effectivement caractérisé par la survenue de crises épileptiques répétées. Seuls un examen EEG ou la présence éventuelle d'une sensation prémonitoire, l'aura, permettent de prévoir et anticiper la survenue d'une crise. Affectant près de 2% de la population mondiale, l'épilepsie est de nos jours le désordre neurologique le plus répandu. Pourtant, on ignore encore sa cause dans près de 75% des cas. (Épilepsie Canada, 2004)

En soi, l'épilepsie est le symptôme d'un trouble neurologique, et non une maladie. Par ailleurs, on se doit de différencier "épilepsie" et "crises épileptiques": l'épilepsie est un trouble cérébral chronique, lequel s'exprime par la récurrence de manifestations aiguës que sont les crises épileptiques. Ainsi, des crises isolées, non répétées, se produisent chez environ 10% de la population mondiale. Ces crises sont le résultat d'un fonctionnement désordonné, excessif ou au contraire inhibé, d'un réseau de cellules cérébrales. Ceci entraîne une modification des rythmes électriques cérébraux et ainsi, des changements brefs et soudains dans le fonctionnement cérébral ; le cerveau envoie alors des messages confus au reste du corps, provoquant notamment les convulsions épileptiques. D'un point de vue fondamental, la crise épileptique correspond donc à une décharge électrique autoentretenu, concernant un ensemble de cellules nerveuses, devenues hyperexcitables et hypersynchrones. La survenue de cette décharge est due à

des conditions anormales, qui déséquilibrent les mécanismes de contrôle protégeant le cerveau en temps normal.

### **I.2.1 BRÈVE HISTOIRE DE L'ÉPILEPSIE**

Les découvertes des préhistoriens ne laissent que peu de doutes sur la question : il y a des milliers d'années que l'on effectue chez l'Homme des trépanations dans un but médical. En témoignent les crânes percés de trous aux formes géométriques que l'on a pu retrouver, datant de l'Égypte ancienne ou de la civilisation Inca. Ainsi, depuis toujours, l'Homme a cherché à comprendre les mécanismes de base du fonctionnement cérébral, mais également son organisation (Weber, 1982).

Les premières descriptions de symptômes épileptiques ont ainsi été retrouvées sur des tablettes babyloniennes, remontant à plus de 2000 ans av. J.C. ; on y retrouve une description très précise de la plupart des types d'épilepsie actuellement connus, mais leur origine était alors supposée surnaturelle (Épilepsie Canada, 2004). L'un des premiers à rejeter le facteur divin de la « Sainte maladie » et à étayer l'origine cérébrale des symptômes épileptiques fut Hippocrate, qui parvint à identifier le rôle joué par les hémisphères cérébraux sur la motricité du côté opposé (Musée Allemand de l'épilepsie, 2004). Il faudra cependant attendre les XVIII<sup>e</sup> et XIX<sup>e</sup> siècles avant que cette hypothèse révolutionnaire ne réussisse à surpasser les conceptions mythiques et surnaturelles accompagnant depuis toujours la « maladie aux mille noms ». Au cours du XVIII<sup>e</sup> siècle, Tissot et son « Traité de l'épilepsie » ont permis de faire la distinction entre épilepsies symptomatique et idiopathique (dont la cause demeure inconnue) (Musée Allemand de l'épilepsie, 2004). Par ailleurs, Hughlings Jackson, neurologue londonien,

émet l'hypothèse que les crises d'épilepsie sont provoquées par des décharges électrochimiques brutales dans le cerveau, et que le type de crise varie selon la localisation et la nature de ces décharges. Dans le même temps, la découverte en 1857 de l'efficacité du bromure dans certains cas d'épilepsie a contribué à atténuer l'ostracisme à l'égard des épileptiques. Puis, durant le XX<sup>ème</sup> siècle, les mises au point successives de l'électroencéphalogramme (EEG) par Berger, et des premiers enregistrements d'une activité de type électrique dans les neurones par Sherrington, ont permis de localiser les foyers épileptogènes et d'envisager des alternatives chirurgicales (Musée Allemand de l'épilepsie, 2004). En outre, l'acquisition d'une meilleure connaissance des mécanismes du fonctionnement cérébral ont permis l'émergence d'une vingtaine de nouveaux antiépileptiques (avec des mécanismes d'action très variés). Toutefois, malgré la large panoplie de médications et d'alternatives aujourd'hui existantes, 25% des cas d'épilepsie demeurent réfractaires à tout traitement.

### **I.2.2 CLASSIFICATION DES CRISES ÉPILEPTIQUES**

Il existe une très grande variété de crises épileptiques dont les causes sont également différentes. On ne peut en effet, ni parler de symptômes, ni de formes de la maladie, au singulier. Toutefois, la Ligue Internationale Contre l'Epilepsie propose une classification qui distingue deux grands types de crises en fonction de critères physiopathologiques (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989)

Les crises partielles ou focales n'affectent qu'une partie limitée du cerveau, la population neuronale touchée par les phénomènes d'hyperexcitabilité et

d'hypersynchronie étant restreinte à un foyer épileptogène. Il peut notamment s'agir d'une petite partie du cortex cérébral, ou encore d'une structure en réseau, tel l'hippocampe qui est fréquemment affecté. Longtemps regroupées sous le terme d'épilepsie du lobe temporal, ces crises partielles peuvent cependant s'amorcer dans le lobe frontal. D'un point de vue symptomatique, elles prennent des formes très variées ; on distingue les crises partielles simples (sans perte de conscience, avec une zone épileptogène située dans une aire primaire du cortex cérébral), les crises partielles complexes (caractérisées par une altération de la conscience dès le début ou en cours de crise) et les crises partielles secondairement généralisées (résultant d'une propagation de l'activité épileptique s'exprimant initialement avec une symptomatologie de crise simple, mais qui, ultérieurement, tend à se généraliser).

Les crises généralisées quant à elles, affectent simultanément le cortex cérébral des deux hémisphères cérébraux, ainsi que des réseaux corticoréticulaires et corticothalamiques. Elles s'accompagnent le plus souvent d'une perte de conscience. Selon la symptomatologie, elles apparaissent sous la forme de crises absence (un type de crise typique de l'enfance, se manifestant par une perte de conscience et l'absence de manifestation motrice (Commission on Pediatric Epilepsy of the International League Against Epilepsy, 1997), ou de crises convulsives généralisées au cours desquelles on peut observer de violents spasmes moteurs.

## **I.3 L'HIPPOCAMPE ET L'ÉPILEPTOGENÈSE**

### **I.3.1 GÉNÉRALITÉS**

L'hippocampe est une structure corticale particulièrement organisée du lobe temporal, qui, associée au cortex entorhinal et au subiculum, constitue la formation hippocampique. Situé au niveau de la zone interne et médiane de chacun des deux hémisphères cérébraux, plus précisément en dessous du corps calleux et en arrière du septum, cette zone télencéphalique bilatéralisée et symétrique appartient au système limbique, système contrôlant notamment l'apprentissage, le système mnésique, les comportements émotionnels, ou encore, les comportements motivationnels. Le système limbique est constitué d'un ensemble de structures sous-corticales et de sous-structures sous-corticales présentant une origine phylogénétique commune et dont les interconnexions sont étroites et nombreuses.

Par ailleurs, l'hippocampe est une région cérébrale qui semble particulièrement sensible à l'initiation des crises d'épilepsie générées au niveau des lobes temporaux (Lothman, 1994; McNamara, 1994): la majorité des patients épileptiques présentent en effet des crises impliquant l'hippocampe, et, de nombreux modèles animaux *in vivo* suggèrent que les crises épileptiques d'origine temporales soient initiées préférentiellement au niveau de l'hippocampe (Bragin et al., 1999b). Ces crises sont d'ailleurs souvent les plus difficiles à contrôler médicalement. De nombreuses recherches ont mis en évidence un lien de causalité entre pathologies hippocampiques et épilepsie chronique, depuis le tristement célèbre cas H.M, atteint de crises convulsives avec pertes de conscience et opéré par Scotville en 1953 d'une lobectomie

temporale médiane bilatérale. Cette double hippocampectomie a effectivement atténué la survenue inopinée des crises épileptiques, mais également entraîné de lourdes conséquences neurologiques, notamment au niveau de la mémoire antérograde. À l'heure actuelle, un grand nombre d'expériences étudiant les mécanismes d'initiation et de propagation des crises sont conduites dans l'hippocampe, considéré comme un foyer épileptogène particulièrement sensible à l'hyperexcitabilité et l'hypersynchronie neuronales (Ishijima *et al.*, 1975; Prince, 1985), compte tenu de son étroite interconnectivité. Il semblerait toutefois que l'hippocampe ventral soit considéré comme étant plus épileptogène que sa portion dorsale chez certaines espèces, dont le rat (Elul, 1964 ; Racine, 1977 ), en raison notamment d'une propagation des décharges épileptiformes à l'ensemble de la structure hippocampale beaucoup plus rapide lorsque celles-ci sont initiées dans la partie ventrale.

### **I.3.2 ORGANISATION GÉNÉRALE DE L'HIPPOCAMPE**

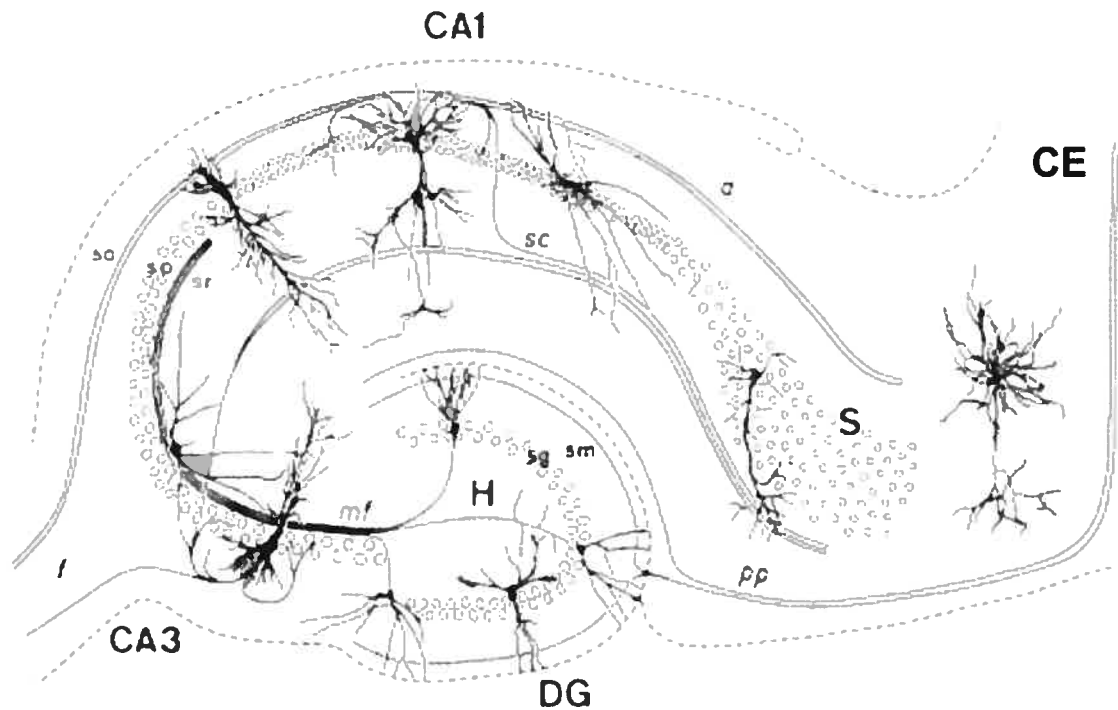
L'hippocampe est assez aisément identifiable de par son apparence en forme de deux « U » entrelacés, due au repliement de deux fines couches de neurones l'une sur l'autre (Figure 1). L'une de ces couches correspond au gyrus dentelé (*fascia dentata*), tandis que l'autre représente la corne d'Ammon (*Cornus Ammonis*) (Ramon y Cajal, 1911 ; Lorente de No, 1934) elle-même sous-divisée en 4 sous-régions, selon des critères morphologiques et de connexions synaptiques, de CA1 à CA4 (CA2 étant généralement confondue avec CA3, du fait de sa faible expansion). L'existence du champ ammonique CA2 a parfois été sujet à controverse (Blackstad & Flood, 1963),



mais celui-ci est désormais reconnu comme étant une sous-région à part entière, caractérisée par des neurones aux propriétés électrophysiologiques distinctes, et jouant un rôle particulièrement important dans la synchronisation de l'activité électrique (Wong *et al.*, 1984)

Le gyrus dentelé est pour sa part constitué de trois couches cellulaires distinctes: la couche granulaire, intermédiaire, au sein de laquelle les cellules granulaires sont regroupées en rangées; une couche dite moléculaire, contenant peu de cellules, mais dans laquelle s'organisent les dendrites apicales des cellules granulaires et leurs afférences; et la couche polymorphe, contenant quelques cellules en panier et surtout les segments proximaux des axones des cellules granulaires, se projetant vers l'aire CA3 (au niveau de la *stratum lucidum*) sous l'appellation de «fibres moussues».

La corne d'Ammon, quant à elle, présente 5 à 6 couches principales, selon la zone, que nous désignerons ici selon la nomenclature internationale : le *stratum alveus*, dans lequel se retrouvent les axones des cellules pyramidales se projetant vers la fimbria ou le subiculum; le *stratum oriens*, contenant des cellules en panier (basket cells), les dendrites basales des cellules pyramidales et quelques afférences issues du septum; la *stratum pyramidale* contenant les corps cellulaires des neurones pyramidaux; le *stratum radiatum* constitué des segments proximaux des dendrites apicales des neurones pyramidaux; et le *stratum lacunosum-moleculare* qui en contient les segments distaux. Dans l'aire CA3, on trouve une sixième couche, le *stratum lucidum*, où se projettent les fibres « moussues » des cellules granulaires du gyrus dentelé.



**Figure 1 : Structure interne de l'hippocampe de rat (coupe transversale).**

**Adapté de Ramon y Cajal (1901)**

**S : subiculum ; H : hile ; DG : gyrus dentelé ; CE : cortex entorhinal ;  
pp : voies perforantes ; mf : fibres moussues ; sc : collatérales de  
Schaffer ; sm : stratum moleculare ; sg : stratum granulosum ; sr :  
stratum radiatum ; so : stratum oriens ; sp : stratum pyramidale**

### I.3.3 COMPOSITION CELLULAIRE DE L'HIPPOCAMPE

L'hippocampe est constitué de différents types de neurones : on distingue ainsi les cellules pyramidales de la corne d'Ammon, les cellules granulaires du gyrus dentelé, et les cellules non-pyramidales.

Les cellules pyramidales, glutamatergiques, présentent un corps cellulaire dont le diamètre est variable selon l'aire impliquée: ainsi, les neurones de l'aire CA1 sont nettement plus petits et denses que ceux des aires CA2/CA3 (Johnston & Amaral, 1998).

Les cellules granulaires sont pour leur part plus petites, et plus arrondies que les cellules pyramidales, et elles n'émettent pas de dendrites basales. Elles se projettent vers le *stratum lucidum* de CA3 via les fibres que l'on nomme « moussues », compte tenu des protubérances épineuses qui caractérisent leur axone. Le neurotransmetteur principal des cellules granulaires est également le glutamate (Johnston & Amaral, 1998).

Parmi les cellules non-pyramidales, on distingue 5 types cellulaires en fonction de critères morphologiques et de localisation: les cellules en corbeille, les cellules en corbeille de type pyramidal, les neurones fusiformes et les cellules bipolaires et multipolaires. La grande majorité des cellules non-pyramidales sont des interneurons inhibiteurs, activés par le glutamate mais relâchant essentiellement le GABA (Abeles, 1991). Certaines d'entre elles libèrent également des neuropeptides tels la cholécystokinine (Morozov & Freund, 2003), le VIP (Emson *et al.*, 1979), la substance P (Vincent *et al.*, 1981), le neuropeptide Y ou encore la somatostatine (Jinno & Kosaka,

2003). De plus, lors des premières semaines de développement, on relève également la présence dans l'hippocampe de cellules non-pyramidales particulières, les cellules de Cajal-Retzius, qui disparaîtraient par la suite ou donneraient lieu à d'autres cellules non-pyramidales (Super *et al.*, 1997). Ces cellules seraient notamment impliquées dans la migration neuronale et la mise en place des premières connexions synaptiques hippocampales (Del Rio *et al.*, 1997), mais pourraient également jouer un rôle en tant que mécanisme de protection contre les dommages générés par les épilepsies du lobe temporal (TLE). En effet, les études de Haas et coll. dans des échantillons humains de patients atteints de TLE (Haas *et al.*, 2002) rapportent une corrélation entre la dispersion des cellules granulaires, indicatrice d'une migration défectueuse de ces cellules, et une diminution de l'expression de la reelin, synthétisée par les cellules de Cajal-Retzius.

Outre la présence de ces cellules pyramidales, granulaires et non pyramidales, on retrouve également dans la population cellulaire hippocampale 4 types de cellules gliales, à savoir les astrocytes, les oligodendrocytes, les fibroblastes et la microglie. Les plus nombreuses sont les astrocytes dont le contact particulier avec les vaisseaux sanguins leur confère un rôle de participation à la barrière hémato-encéphalique. En outre, les astrocytes régulent les taux de neurotransmetteurs synaptiques et les concentrations extracellulaires de certains ions ou molécules tels le glutamate ou le potassium, en réduisant leur diffusion puis en les recaptant, de façon à assurer un fonctionnement neuronal adéquat. Les oligodendrocytes, quant à eux, sont de larges cellules avec de longues excroissances extrêmement ramifiées qui sont impliquées dans la myélinisation des axones. Les cellules microgliales, ou microglie, seraient pour leur

part assignées à une fonction de phagocytose, de manière à éliminer les éventuels déchets de dégénérescence cellulaire. Enfin, les fibroblastes, correspondent à de larges cellules plates et sans excroissance, qui assurent principalement un rôle de soutien.

### **I.3.4 LES INTERCONNEXIONS DE L'HIPPOCAMPE : LE CIRCUIT TRISYNAPTIQUE**

L'une des particularités de l'hippocampe réside dans son étroite interconnectivité, notamment illustrée par son circuit trisynaptique. Cette boucle excitatrice glutamatergique est formée par les projections perforantes du cortex entorhinal vers les neurones du gyrus dentelé, dont les fibres moussues projettent massivement vers les neurones pyramidaux de CA3; les axones de ces derniers, formant les collatérales de Schaffer, contactent ensuite les neurones pyramidaux de CA1. Puis, la principale voie de sortie hippocampale est assurée par les projections de CA1 directement vers le cortex entorhinal, ou à travers le subiculum (Buzsaki, 1996). Ainsi, en constituant à la fois la voie d'entrée et de sortie de l'hippocampe, le cortex entorhinal joue un rôle d'intermédiaire dans le dialogue entre les structures hippocampiques et corticales. Cette organisation en boucle trisynaptique excitatrice n'est cependant pas l'unique organisation interne hippocampale, puisque les cellules de CA3 forment également un circuit récurrent, contactant d'autres cellules de CA3 par des collatérales axoniques. Les cellules de la région CA1 sont en revanche moins fortement interconnectées que celles de CA3.

## **I.4 LE NÉOCORTEX ET L'ÉPILEPSIE**

### **I.4.1 ORGANISATION GÉNÉRALE DU NÉOCORTEX**

L'ensemble du néocortex et de ses connexions représentent à eux seuls plus de 80% du volume total du cerveau humain (Douglas & Martin, 1997). Chez les mammifères, ce feuillet cellulaire d'environ 2 mm d'épaisseur est subdivisé en 6 couches cellulaires horizontales (I-VI, de la plus externe à la plus interne), bien que dans certaines régions, un nombre plus élevé de couches cellulaires ait été mis en évidence (Douglas & Martin, 1997). Chacune de ces couches est caractérisée par des types neuronaux, des afférences, et des efférences spécifiques.

Les neurones pyramidaux, utilisant le glutamate comme neurotransmetteur, sont de loin les cellules les plus représentées dans le néocortex (Parnavelas, 1990). Leur nom est dû à la forme pyramidale de leur corps cellulaire, dont l'apex pointe généralement vers la surface corticale tandis que la base est dirigée en direction de la matière blanche. Leur densité et le diamètre de leur corps cellulaire sont variables selon l'aire et la couche cellulaire impliquées (Abeles, 1991). L'axone particulièrement long de ces neurones excitateurs pyramidaux projette vers d'autres aires néocorticales, ou d'autres régions hors du néocortex. (Sutor, 2002). On y distingue la dendrite apicale, au diamètre particulièrement large et s'étendant en direction de la surface corticale, des dendrites basales, qui se déploient dans une direction oblique vers la matière blanche. Tandis que l'axone des neurones pyramidaux génère des synapses de type asymétrique, le corps cellulaire et les dendrites reçoivent des synapses de type symétrique et asymétrique. On observe toutefois de nombreuses variantes à cette description typique du neurone pyramidal cortical (Abeles, 1991).

Les neurones étoilés épineux présentent également une morphologie typique, avec des dendrites recouvertes d'épines s'étendant dans toutes les directions autour du corps cellulaire. Tout comme les neurones pyramidaux, les cellules étoilées épineuses reçoivent presque exclusivement des synapses symétriques inhibitrices au niveau de leur corps cellulaire et du segment initial des dendrites, tandis que leur axone génère des synapses asymétriques (et probablement excitatrices). Ces neurones étoilés épineux sont principalement retrouvés dans les couches intermédiaires du cortex (Abeles, 1991).

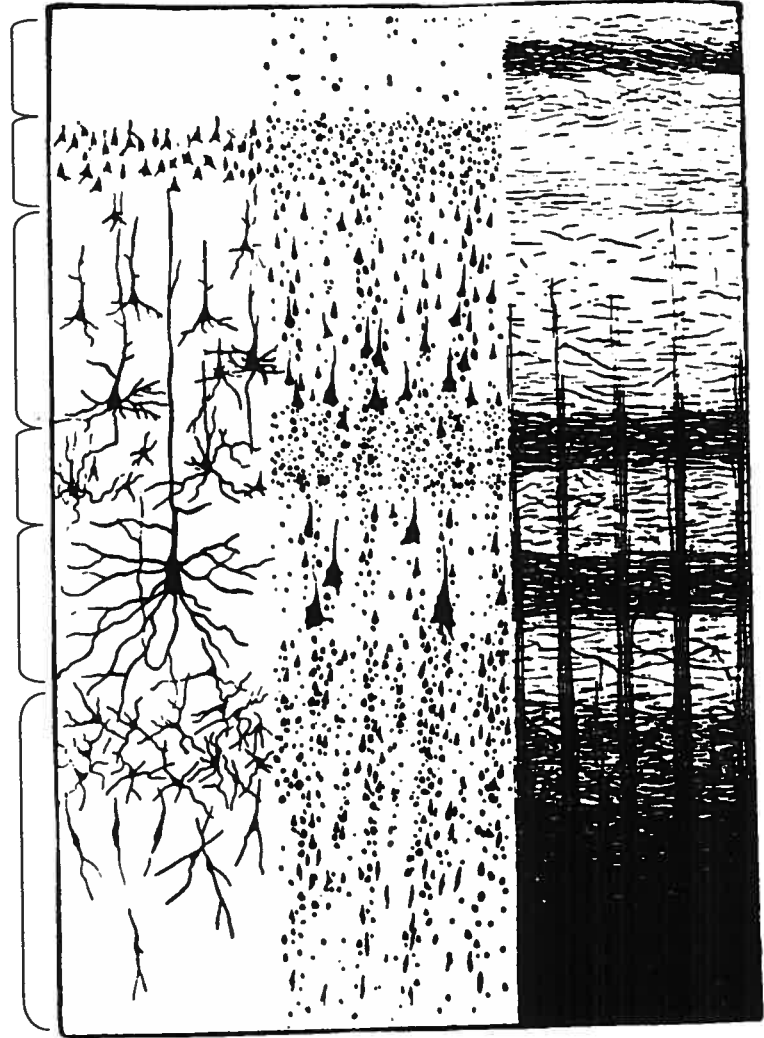
De plus, dans toutes les couches néocorticales, on recense également des cellules lisses étoilées GABAergiques (Parnavelas, 1990), dont l'axone donne lieu à des synapses de type symétrique, tandis que le corps cellulaire et les dendrites reçoivent à la fois des synapses de type symétrique et asymétrique (Abeles, 1991).

La couche néocorticale I est caractérisée par une très faible densité cellulaire et de larges faisceaux de neurites, issues des dendrites apicales des neurones pyramidaux des couches II/III et V, ainsi que des axones de neurones corticaux et sous-corticaux projetant vers le néocortex (Sutor, 2002). La couche II présente principalement des neurones pyramidaux, tout comme la couche III, mais dont le diamètre est plus grand dans cette dernière. La couche IV, quant à elle, contient dans sa partie la plus externe une combinaison de cellules étoilées et de neurones pyramidaux de petits et moyens diamètres, et dans sa partie la plus interne, est presque exclusivement constituée de neurones étoilés. Cette couche, dite granulaire, représente la principale voie d'entrée vers le néocortex. La couche V est également constituée d'un amalgame des divers types cellulaires corticaux, mais se distingue par la présence de neurones pyramidaux

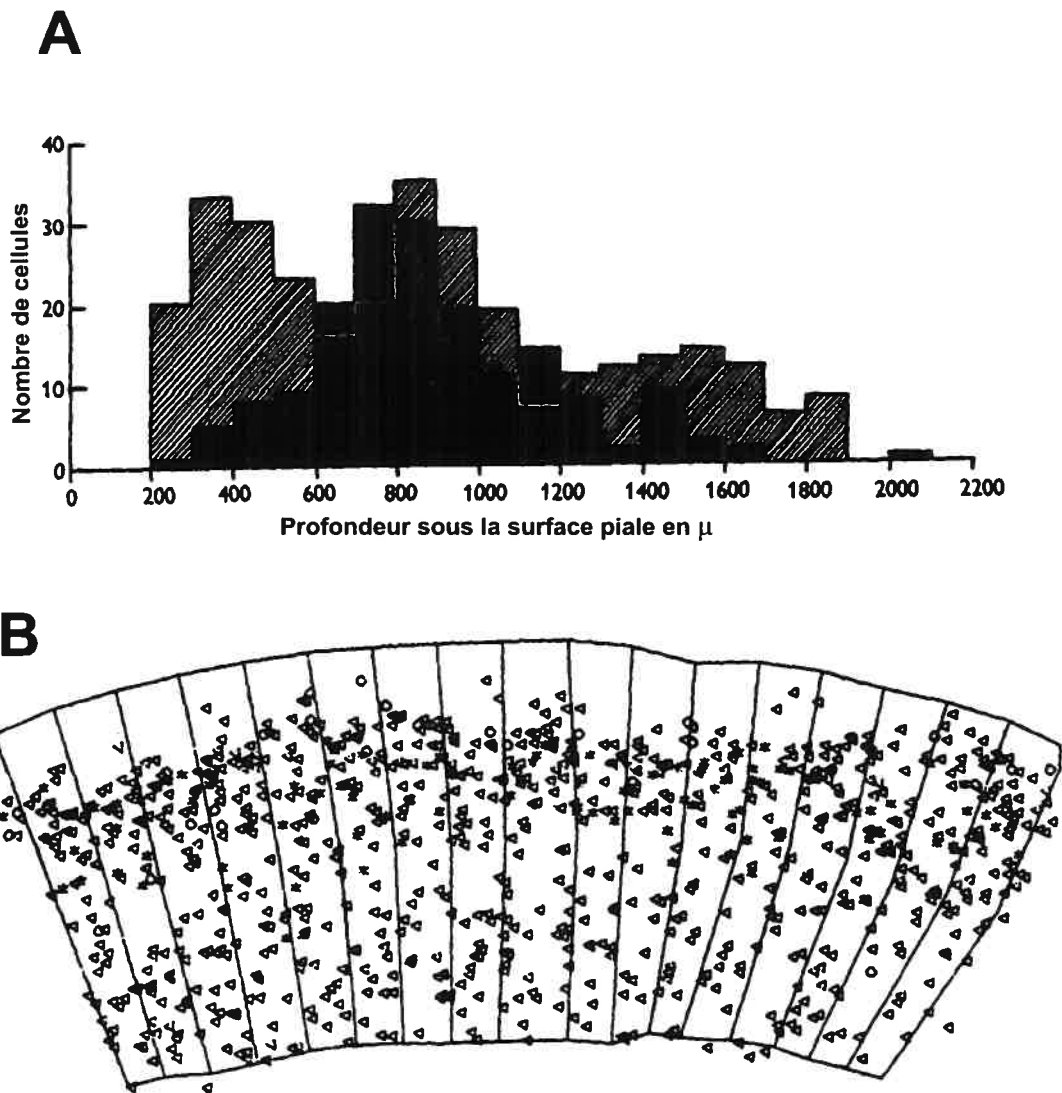
de très grand diamètre, absents de la couche VI, où l'on retrouve essentiellement des cellules pyramidales de forme allongée (aussi appelées neurones fusiformes) (Abeles, 1991). Chacune des couches néocorticales ayant une constitution cellulaire et une organisation propre (Figure 2), l'activité électrique qui pourra y être enregistrée présentera également des caractéristiques différentes (Ferguson & Jasper, 1971; Abbes *et al.*, 1991).



- I Couche moléculaire
- II Couche granulaire externe
- III Couche pyramidale externe
- IV Couche granulaire interne
- V Couche pyramidale interne
- VI Couche multiforme



**Figure 2 : Coupes histologiques du néocortex colorées avec les méthodes de Golgi (gauche), Nissl (centre) et Weigert (droite). La méthode de Golgi met en évidence un faible pourcentage des neurones avec leurs prolongements cellulaires ; la méthode de Nissl colore les corps cellulaires de tous les neurones; la méthode de Weigert visualise les axones myélinisés (D'après Gray, 1954).**



**Figure 3 : Distribution corticale laminaire des différents types de neurones**

- A.** L'aire hachurée représente le nombre de cellules pyramidales en fonction de la distance piaie ; l'aire noircie illustre le nombre de cellules étoilées (dont les neurones étoilés épineux)
- B.** Neurones imprégnés par la technique de Golgi dans une tranche de cortex de lapin, et où sont représentées les cellules pyramidales (triangles), les cellules lisses (étoiles) et toutes les autres cellules non pyramidales (cercles) (D'après Abeles, 1991).

Parallèlement à cette organisation horizontale, des colonnes verticales, interconnectées par des fibres horizontales (Gilbert, 1992), ont également été relevées (Goldman & Nauta, 1977; Hubel & Wiesel, 1977). Cette organisation en colonnes, allant de la matière blanche à la surface piaie, constitue le fondement des fonctions intégratives et cognitives du néocortex, en favorisant les assemblages cellulaires en réseaux neuronaux particulièrement complexes au sein de ces colonnes (Szentagothai, 1978).

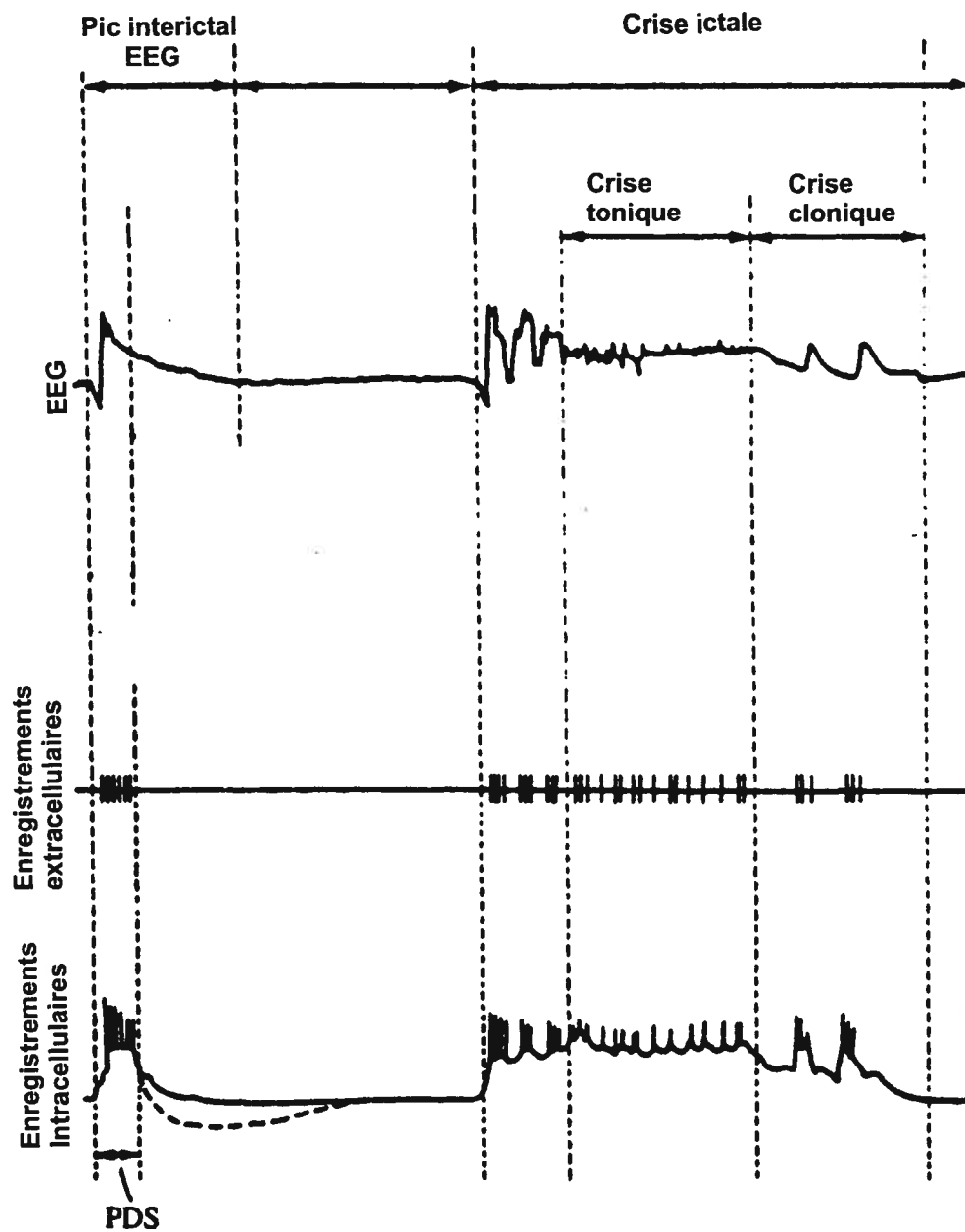
Par ailleurs, le néocortex reçoit de nombreuses afférences, notamment depuis le thalamus qui projette dans toutes les aires corticales, en particulier au niveau des couches moyennes (Jones, E.G., 1985). Toutefois, bien que le thalamus constitue l'afférence principale du néocortex, plus de vingt structures sous-corticales se projettent également sur lui, dont notamment le locus coeruleus, le claustrum, le prosencéphale basal et les noyaux raphé dorsal et raphé médian (Douglas & Martin, 1997). De plus, les connexions cortico-corticales occupent un rôle de tout premier plan, la plupart des fibres de la matière blanche étant impliquées dans des connexions intra- ou interhémisphériques (Douglas & Martin, 1997).

#### **I.4.2 CONTRIBUTION DU NÉOCORTEX À L'ÉPILEPTOGENÈSE**

Bien que la capacité d'épileptogenèse des neurones néocorticaux de la couche V ait d'ores et déjà été démontrée (Connors et al., 1982; Abbes *et al.*, 1991), un nombre moindre d'études épileptologiques ont été conduites dans le néocortex comparativement au rôle de premier ordre accordé à l'hippocampe. Effectivement, compte tenu de la diversité neuronale et structurelle du néocortex mais également de la

complexité de ses réseaux neuronaux (Szentagothai, 1978), de telles études s'avéraient particulièrement délicates. Cependant, outre son implication éventuelle dans les mécanismes de génération de l'activité épileptique (Hoffman & Prince, 1995; Tsau *et al.*, 1999), le néocortex joue également un rôle prépondérant dans la propagation de telles activités (Valenzuela & Benardo, 1995; De Curtis & Avanzini, 2001). En effet, il a été montré *in vitro* que des manipulations affectant l'inhibition GABAergique ou au contraire renforçant l'excitation glutamatergique dans des tranches néocorticales avaient un effet facilitateur envers l'activité épileptiforme. Ainsi, la perfusion de bicuculline, un antagoniste GABA<sub>A</sub>, conduit, dans des tranches néocorticales humaines, à la génération de décharges épileptiformes évoquées par stimulation électrique (Hwa *et al.*, 1991). En revanche, aucune activité synchrone spontanée n'a pu être enregistrée dans ces mêmes conditions (Hwa *et al.*, 1991). Parallèlement à cela, la perfusion sur des tranches néocorticales d'un liquide cérébro-spinal artificiel (ACSF) contenant une faible concentration de Mg<sup>++</sup>, ce qui rend optimale l'activation des récepteurs glutamatergique NMDA en dévoilant leur site de fixation, entraîne la manifestation de décharges épileptiformes spontanées (Avoli *et al.*, 1991).

De plus, les échantillons humains prélevés lors d'opérations chirurgicales de patients épileptiques étant principalement d'origine corticale, les études *in vitro* des mécanismes de génération et de propagation de l'activité épileptique dans cette structure s'avèrent fondamentales.



**Figure 4 : Diagramme schématique des relations entre décharges corticales et activités intra- et extracellulaires dans un foyer épileptique (adapté de Ayala *et al.*, 1973)**

## **1.5 LES MÉCANISMES CELLULAIRES ÉPILEPTOGÈNES**

### **1.5.1 ÉLECTROPHYSIOLOGIE DE L'ACTIVITÉ ÉPILEPTIQUE**

D'un point de vue électroencéphalographique, le paroxysme pointe-onde, caractéristique fondamentale de la crise épileptique (Figure 4), représente la traduction à la surface du crâne, des champs électriques créés par les mouvements ioniques au niveau neuronal. Sa pointe correspond à la sommation des dépolarisations paroxysmiques neuronales (PDS) à l'origine de bouffées de potentiels d'action, tandis que l'onde lente concorde avec une hyperpolarisation, par entrée d'ions chlorure  $\text{Cl}^-$  et sortie d'ions potassium  $\text{K}^+$  du soma neuronal, et met ainsi fin à la décharge épileptique (Ayala *et al.*, 1973; Prince & Connors, 1986). Au sein d'un foyer épileptique, les neurones présentant des PDS se retrouvent au centre du foyer, tandis que la périphérie est constituée d'une «ceinture» de neurones hyperpolarisés : ceci contribue à limiter la propagation de la décharge épileptique hors du foyer lui-même (Prince & Wilder, 1967; Ishijima *et al.*, 1975). Cependant, lors de crises soutenues, la dépolarisation neuronale imposée par les neurones centraux du foyer peut durer jusqu'à quelques secondes, au cours desquelles d'intenses décharges peuvent se propager hors du foyer épileptique, permettant ainsi la généralisation de la crise (Ayala *et al.*, 1973). Des enregistrements intracellulaires réalisés sur des échantillons corticaux humains, excisés chez des patients souffrant d'épilepsie réfractaire à tout traitement, ont montré que les neurones corticaux étaient aptes à générer des PDS spontanés (Schwartzkroin & Haglund, 1986).

En distinguant deux types de périodes, l'une dite « ictale » durant laquelle le sujet présente effectivement une crise, et l'autre interictale, entre chaque période ictale, on discerne également deux types d'activités électriques lors de l'EEG (Figure 4). Au cours de la période interictale, de brèves décharges (<50 ms) d'amplitude élevée (>50 $\mu$ V), suivies d'une onde lente de plusieurs centaines de millisecondes, sont observées de façon périodique. Ces décharges sont en fait l'expression extracellulaire de décharges excessives et finement synchronisées (les PDS) émises par un ensemble de neurones, comme le démontrent les nombreuses expériences au cours desquelles des enregistrements extra- et intracellulaires ont été effectués simultanément *in vivo* (Matsumoto & Marsan, 1964) ou *in vitro* (De Curtis *et al.*, 1999). On distingue cette activité dite interictale de l'activité non-épileptique « normale » d'après divers critères qualitatifs et quantitatifs, ce dernier type de décharges étant irrégulier, et présentant une amplitude plus faible, mais une durée plus longue comparativement à l'activité épileptique interictale (De Curtis & Avanzini, 2001). On parle de « région irritante » pour localiser la zone cérébrale impliquée dans la génération de décharges épileptiformes interictales. Ainsi, le neocortex (Scherg *et al.*, 1999), en particulier au niveau des couches cellulaires IV-V (Connors, 1984; Chagnac-Amitai & Connors, 1989), serait une région particulièrement propice à la génération de décharges interictales, tout comme les aires hippocampales CA1 (Azouz *et al.*, 1996; De Curtis & Avanzini, 2001) et CA3 (Avoli & Barbarosie, 1999; De Curtis & Avanzini, 2001; Dzhala & Staley, 2003).

L'activité de type ictal, est caractérisée par une morphologie à l'EEG totalement différente de celles des décharges interictales (Figure 4), suggérant qu'il ne s'agit pas de la simple expression d'un renforcement ou d'une augmentation de l'activité interictale, mais d'un phénomène médié par un mécanisme neuronal propre (De Curtis & Avanzini, 2001). L'activité ictale se présente en effet sous la forme de décharges très rapides, se succédant à haute fréquence (10-20 Hz) (Dzhala & Staley, 2003) et ce durant deux jusqu'à plusieurs dizaines de secondes (Kohling *et al.*, 2000). Le foyer des épilepsies du lobe temporal (TLE), où les décharges ictales prennent origine, se situerait principalement dans la formation hippocampale (Bragin *et al.*, 1999a), en particulier au niveau de l'aire CA3 (Traub & Wong, 1982; Jensen & Yaari, 1988; Dzhala & Staley, 2003) et du cortex entorhinal (Avoli & Barbarosie, 1999).

S'agissant de la transition d'évènements interictaux en décharges ictales, une controverse existe quant au rôle joué par les décharges interictales. Ainsi, selon Dzhala et Staley (2003), les décharges ictales ne pourraient être générées qu'à la suite d'une dégradation de l'activité interictale, et cette transition serait caractérisée par un accroissement de la vitesse de propagation des évènements interictaux, une augmentation des décharges ultérieures secondaires et un déplacement du lieu d'où proviennent ces décharges de CA3a-b vers CA3c. Ces décharges pourraient ainsi servir d'indicateur, de façon à anticiper et prévenir les crises annoncées. De même, les expériences réalisées par Avoli *et al.* (Avoli & Barbarosie, 1999) suggèrent que la présence des décharges interictales empêche la survenue de décharges ictales. Cependant, selon d'autres auteurs, ces mêmes décharges interictales n'auraient que peu d'incidence sur la génération de crises, et correspondraient à un reflet des crises passées



plutôt qu'à une indication de celles à venir (Gotman, 1991; De Curtis & Avanzini, 2001)

### **I.5.2 LES MÉCANISMES DE GÉNÉRATION DES CRISES**

Bien que toujours incomplètes, nos connaissances des mécanismes épileptogéniques ne cessent de croître et d'enrichir la base fondamentale de l'épileptogénèse que sont l'hypersynchronie et l'hyperexcitabilité neuronales, innées ou acquises (Schwartzkroin, 1987; Meldrum, 1990; Dichter, 1993). Les causes et situations à l'origine de crises épileptiques sont en effet très nombreuses et variées (traumatisme crânien, accident cérébro-vasculaire, infection du système nerveux central (SNC), tumeurs cérébrales, crise post-chirurgicale, intoxication, sevrage, troubles métaboliques, fièvres, etc. ; le plus souvent, la cause demeure indéfinie) (Baldy-Moulinier, 1997) et on distingue généralement les anomalies fonctionnelles des anomalies anatomiques.

Tous ces facteurs peuvent engendrer des décharges électriques excessives, hypersynchrones au sein d'un foyer épileptique, qui sont imputées à diverses anomalies biochimiques (Prince & Connors, 1986; Jefferys, 1990). Il peut s'agir de modifications affectant directement les propriétés membranaires intrinsèques des neurones, par l'altération de la composition ou la distribution des canaux ioniques voltage-dépendants, des canaux  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ; ou encore de modifications indirectes de ces propriétés par suite de perturbations de la transmission synaptique entre neurones, d'inhibition de la neurotransmission inhibitrice GABAergique (désinhibition) ou, au contraire, d'une augmentation de la neurotransmission GABAergique qui favorise

l'hypersynchronie neuronale en renforçant la neurotransmission excitatrice glutamatergique (Dingledine *et al.*, 1990; Heinemann *et al.*, 1991), ou encore d'une altération des systèmes neuromodulateurs tels l'adénosine et l'acétylcholine. Ainsi, différents ajustements synaptiques ont été relevés comme jouant le rôle d'agents épileptogènes dans le cadre d'épilepsies focales.

### **I.5.2.1 La transmission excitatrice glutamatergique et l'épileptogénèse**

Par exemple, selon les sous-unités NR1 et NR2 le constituant, le récepteur glutamatergique NMDA pourra ou non présenter une augmentation de son activité constitutive (Monyer *et al.*, 1992). Lors d'expériences évaluant *in vitro* le degré d'expression de NR1 et NR2A/B au sein des récepteurs NMDA, les densités de sous-unités NR2A/B présentaient des niveaux plus élevés dans les échantillons corticaux prélevés de foyers épileptogènes, comparativement aux tissus corticaux avoisinants, non épileptogènes (Najm *et al.*, 2000). De plus, le blocage de transmission synaptique excitatrice médiée par les récepteurs non-NMDA dans le cortex supprime la génération de PDS et de décharges interictales (De Curtis *et al.*, 1999). Diverses études des récepteurs glutamatergiques métabotropiques tendent à prouver que les sous-types mGluR1 auraient un effet proconvulsifs, tandis que les sous-types mGluR2 et mGluR3 seraient plutôt anticonvulsifs (Cartmell *et al.*, 1993; Merlin *et al.*, 1995).

### **I.5.2.1 La transmission inhibitrice GABAergique et l'épileptogénèse**

De nombreux indices suggèrent également que la désinhibition GABAergique puisse jouer un rôle de premier ordre dans les mécanismes d'épileptogénèse. L'altérabilité des potentiels post-synaptiques inhibiteurs (IPSP) lors de stimulations répétitives de diverses structures du SNC (McCarren & Alger, 1985; Deisz & Prince, 1989) laisse en effet supposer que l'inhibition GABAergique ne puisse soutenir l'activation synaptique intense et les décharges de potentiels d'action (PA) à haute fréquence caractérisant le réseau neuronal épileptogène (Prince *et al.*, 1997). Par ailleurs, divers bloqueurs des récepteurs GABA<sub>A</sub>, tels la pénicilline et la bicuculline, sont de puissants convulsivants, aptes à induire des foyers épileptogéniques aigus (cf Prince, 1978). De la même manière, la diminution ou l'absence de la protéine codant pour le récepteur GABA<sub>A</sub> induit la survenue de crises épileptiques (pour revue : Olsen & Avoli, 1997), suggérant également que la désinhibition puisse être un des mécanismes pathogénétiques conduisant à une épileptogénèse chronique (Prince *et al.*, 1997). En effet, en condition d'hyperexcitabilité, la diminution du seuil d'excitabilité augmente la probabilité d'évènements synaptiques spontanés, permettant alors une sommation spatio-temporelle graduelle des potentiels post-synaptiques et ainsi l'initiation synchronisée de nouveaux potentiels d'action dans les neurones avoisinants (Chamberlin *et al.*, 1990; Hoffman & Haberly, 1991). Ceux-ci vont entraîner, en retour, une excitation synaptique récurrente de rétrocontrôle, prolongeant la dépolarisation membranaire et favorisant la survenue de nouvelles décharges (Traub & Wong, 1982; Hablitz, 1984; De Curtis & Avanzini, 2001).

Par ailleurs, le renforcement de l'inhibition GABAergique semble également, et paradoxalement, jouer un rôle dans l'hypersynchronie neuronale. En effet, l'activation d'un réseau local d'interneurones inhibiteurs provoquant une hyperpolarisation membranaire transitoire entraînerait la synchronisation neuronale de cellules principales du cortex (Cobb *et al.*, 1995)

### **I.5.2.3 Les neuromodulateurs et l'épileptogénèse**

Enfin, l'acétylcholine (ACh) et l'adénosine sont deux neuromodulateurs endogènes qui semblent particulièrement impliqués dans le contrôle des conditions épileptogènes. L'adénosine pourrait ainsi, selon les conditions, jouer un rôle inhibiteur ou excitateur. Celle-ci jouerait essentiellement un rôle anticonvulsif via les récepteurs A<sub>1</sub>, inhibant la neurotransmission glutamatergique hippocampale (Ribeiro *et al.*, 2002), mais des controverses demeurent quant aux réponses électrophysiologiques des récepteurs A<sub>2</sub>, A<sub>2A</sub> étant supposé excitateur, et la réponse électrophysiologique d'A<sub>2B</sub> étant toujours indéterminée (pour revue Dunwiddie, 1999). Par ailleurs, diverses expériences ont démontré une augmentation des concentrations cérébrales d'adénosine au cours d'une crise épileptique (Schrader *et al.*, 1980; Lewin & Bleck, 1981; During & Spencer, 1993); l'adénosine ayant un effet anticonvulsivant dans de nombreux modèles de crises expérimentales, ceci suggère la possible implication de l'adénosine dans les mécanismes d'arrêt des crises (Dunwiddie, 1999).

Quant au rôle de premier plan joué par l'ACh dans les mécanismes épileptiques, il est illustré par le cas d'une famille autrichienne chez laquelle on a décelé une mutation

génétique non-sens dans l'une des sous-unités du récepteur nicotinique, associée avec une épilepsie nocturne du lobe frontal (Steinlein *et al.*, 1995; Weiland *et al.*, 1996). Les mécanismes d'action de l'ACh et son implication dans le cadre de l'épilepsie seront détaillés plus avant dans la section I.7.

Pour ce qui est des épilepsies lésionnelles, un remaniement histologique et fonctionnel pourrait être à l'origine de la diminution du seuil d'excitabilité neuronale favorisant la survenue de décharges épileptiques, excessives et hypersynchrones. (Mathern *et al.*, 1995)

### **I.5.3 LES MÉCANISMES DE PROPAGATION DES CRISES**

Au sein du néocortex, on observe une propagation asymétrique (Chervin *et al.*, 1988) de l'activité épileptique de façon verticale, d'une couche cellulaire à l'autre (Ebersole & Chatt, 1984; Albowitz & Kuhnt, 1995), mais également de manière tangentielle en direction des couches supragranulaires (Barth *et al.*, 1990; Telfeian and Connors, 1998). Cette dernière est assurée par le système de fibres associatives cortico-corticales formé notamment des axones des neurones de la couche V, dotés de la capacité intrinsèque de générer des décharges (Chagnac-Amitai & Connors, 1989) et rejoignant la couche moléculaire superficielle (Alefeld *et al.*, 1998). Cette propagation est alors assurée le long des connexions excitatrices et inhibitrices associatives ; la propagation temporelle comme spatiale étant ainsi dépendante des caractéristiques de connectivité de la zone cérébrale impliquée (De Curtis & Avanzini, 2001). Une composante non-synaptique intervient également dans la propagation de l'activité épileptiforme ainsi que de nombreuses études l'ont démontrée, dont la nôtre, mettant en

relief l'implication des jonctions électriques (gap-junctions) dans la transmission de l'activité épileptiforme. Toutefois, l'asymétrie de la propagation spatiale de l'activité épileptique tend à limiter l'importance du rôle joué par les événements non-synaptiques dans la propagation corticale des crises (De Curtis & Avanzini, 2001).

Dans l'hippocampe, généralement considéré comme étant le foyer épileptogène des TLE, l'activité interictale serait générée au sein de l'aire CA3a-b (Avoli & Barbarosie, 1999), tandis que l'activité ictale le serait dans l'aire CA3c (Dzhala & Staley, 2003) et le cortex entorhinal (Avoli *et al.*, 1996). L'activité interictale générée en CA3 se propagerait ensuite vers CA1, via les collatérales de Schaffer (Avoli & Barbarosie, 1999; Dzhala & Staley, 2003), puis gagnerait le cortex entorhinal directement, ou via le subiculum, avant d'atteindre de nouveau la région CA3 via le gyrus dentelé, empruntant ainsi la boucle hippocampo-entorhinale (Avoli & Barbarosie, 1999). L'activité ictale générée au niveau du cortex entorhinal se propagerait vers l'aire CA3 via le gyrus dentelé, qui assure ici un rôle de filtre de l'information transmise (Dreier & Heinemann, 1991; Lothman & Williamson, 1993; Avoli *et al.*, 1996), puis serait dirigée vers l'aire CA1 via la boucle trisynaptique. Toutefois, contrairement à ce qui a été observé au sujet de l'activité interictale, certaines expériences pratiquées sur des tranches combinant l'hippocampe et le cortex entorhinal (Avoli *et al.*, 1996), n'ont pu enregistrer aucune transmission des décharges ictales depuis l'aire CA1 vers le cortex entorhinal ou le subiculum.

#### **I.5.4 CONTRIBUTION DES JONCTIONS ÉLECTRIQUES ET FACTEURS NON-SYNAPTIQUES**

La génération et la propagation des décharges épileptiques ne sont possibles que lorsque les PDS neuronaux se produisent dans une population de cellules suffisamment nombreuse et synchronisée. Divers mécanismes interviennent pour favoriser cet état d'hypersynchronie neuronale, dont les interactions synaptiques excitatrices, les interactions synaptiques inhibitrices et les phénomènes non-synaptiques (De Curtis & Avanzini, 2001). Les phénomènes non-synaptiques interviendraient dans l'hypersynchronie neuronale observée en condition d'épileptogenèse, ainsi que l'ont démontrées diverses expériences au cours desquelles des neurones hippocampaux ont pu générer des décharges spontanées hautement synchronisées en l'absence de toute transmission synaptique (Jefferys & Haas, 1982; Taylor & Dudek, 1982). Les phénomènes non-synaptiques impliqués dans l'épileptogenèse ainsi que dans la propagation de l'activité épileptique ictale et interictale (De Curtis and Avanzini, 2001) comprendraient les jonctions électriques (gap-junctions), la transmission éphaptique faisant intervenir les effets de champs électriques et les interactions ioniques telles les augmentations de la concentration extracellulaire potassique (Dudek *et al.*, 1998).

##### **I.5.4.1 Les jonctions électriques et l'épileptogenèse**

L'abolition des décharges interictales et ictales par l'application de bloqueurs de jonctions électriques a été démontrée dans divers modèles d'épileptogenèse. Ce système de communication intercellulaire est sous-tendu par la mise en contact de deux cellules, via des complexes protéiques membranaires appelés connexons, lesquels sont formés de l'assemblage de 6 connexines de poids moléculaire variable. Cet assemblage

permet la formation d'un pore de faible résistance électrique, autorisant un transfert cytoplasmique direct de petites molécules (<1500Da) et d'activités électriques d'une cellule à l'autre (Kumar & Gilula, 1996; Carlen *et al.*, 2000). On retrouve au moins 8 connexines différentes dans le SNC des mammifères (eg :cx 26, 30, 32, 36, 37, 40, 43 et 45), dont 4 à la surface de la membrane neuronale (cx 26, 32, 36, 43) (Condorelli *et al.*, 1998; Carlen *et al.*, 2000). Par ailleurs, bien que l'expression des connexines soit particulièrement élevée dans les cellules gliales, leur présence dans les neurones a également été établie (Nadarajah *et al.*, 1996; Belliveau *et al.*, 1997), notamment dans ceux de l'aire hippocampale CA1 (Simburger *et al.*, 1997). Selon les connexines qui la constituent, une jonction électrique pourra présenter différentes propriétés biophysiques et modulateurs (Spray, 1996). Ces jonctions peuvent ainsi intervenir dans la modulation d'une variété de signaux selon différents mécanismes (Carlen *et al.*, 2000). Lors d'enregistrements extracellulaires dans des tranches d'hippocampe, en dépit d'une diminution de la concentration calcique extracellulaire suffisante pour abolir la communication polysynaptique (Perez-Velazquez *et al.*, 1994), de larges pics de population synchrones ont été enregistrés dans la région CA3 (Taylor & Dudek, 1982) et dans la région CA1 (Jefferys & Haas, 1982; Konnerth *et al.*, 1984). L'augmentation de la concentration calcique extracellulaire supprime effectivement toute transmission polysynaptique par un effet stabilisateur sur la membrane neuronale (Berry & Pentreath, 1976), tandis que la diminution de la concentration calcique extracellulaire entraîne une hyperexcitabilité en raison de la diminution de la disponibilité cationique extracellulaire (Frankenhaeuser & Hodgkin, 1957; Hahin & Campbell, 1983), du blocage des courants hyperpolarisants induits par le calcium (Alger & Nicoll, 1980;



Hotson & Prince, 1980) et d'une dégradation de l'inhibition GABAergique (Jones & Heinemann, 1987). Parallèlement à cette hyperexcitabilité, la diminution de la concentration calcique extracellulaire bloque la relâche de neurotransmetteurs, laquelle nécessite une entrée de calcium via les canaux  $Ca^{++}$  présynaptique de type N et P/Q (Reid *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données suggère donc fortement que la communication électrique soit une condition *sine qua non* de l'établissement d'une synchronisation rapide des potentiels d'actions des cellules pyramidales (Jefferys, 1995; Dudek *et al.*, 1998). Cependant, du fait que les neurones ne semblent généralement former des jonctions électriques qu'avec quelques neurones avoisinants, sinon un autre neurone seulement, dans le néocortex tout comme dans l'hippocampe (Gutnick & Prince, 1981), la seule présence des jonctions électriques interneuronales ne semble pas suffisante pour expliquer l'hypersynchronie observée durant le blocage de la transmission polysynaptique (Dudek *et al.*, 1998). En revanche, de nombreuses jonctions électriques sont retrouvées au niveau des cellules gliales, comme le démontrent les résultats d'expériences d'injection intragliale de jaune Lucifer (Gutnick & Prince, 1981; Binmoller & Muller, 1992). Les cellules gliales pourraient ainsi participer au phénomène d'hypersynchronie neuronale observée en absence de calcium extracellulaire. De plus, il a été observé que l'administration de convulsivants chez l'aplysie, un invertébré, donne lieu à une augmentation substantielle de l'efficacité de la transmission électrique (Rayport & Kandel, 1981). Ceci suggère que l'augmentation de la transmission électrique pourrait jouer un rôle prépondérant dans la propagation de l'activité épileptique en contribuant à l'hypersynchronie neuronale. Parallèlement, il faut souligner que les études menées sur des échantillons necorticaux de patients

épileptiques ont démontré une augmentation significative des niveaux d'expression de la cx43 et, de façon moindre, de la cx 32 (Naus *et al.*, 1991). À l'heure actuelle, l'implication des jonctions de type électrique dans la génération et le maintien de l'activité épileptique ne soulève plus de doutes. Reste que l'importance de leur rôle demeure sujette à controverse.

#### **I.5.4.2 La communication éphaptique et l'épileptogenèse**

Par ailleurs, le mouvement ionique et aqueux transmembranaire associé au phénomène de PDS génère un gonflement neuronal et glial, réduisant ainsi le volume d'espace extracellulaire (McBain *et al.*, 1990; Andrew & MacVicar, 1994). De cette façon, la communication éphaptique entre neurones se trouve accrue, ce qui signifie qu'un contact non-synaptique se forme entre neurones, permettant une forme de transmission de cellule à cellule via l'espace extracellulaire, mais sans établir de synapse. Lors d'expériences tendant à augmenter le volume extracellulaire (par un traitement à la furosemide), Hochman *et al.* (1995) ont ainsi constaté une perte de l'hypersynchronie neuronale suffisante pour abolir l'activité épileptiforme, sans pour autant affecter l'hyperexcitabilité.

#### **I.5.4.3 La pression osmotique et l'épileptogenèse**

De la même façon, de nombreuses études ont démontré l'impact de l'état osmotique sur l'hyperexcitabilité neuronale. Ainsi un état cellulaire hyperosmotique tend à hyperpolariser les neurones (Andrew *et al.*, 1989) et à protéger contre la survenue de

crises épileptiques, un état hypoosmotique favoriserait l'hyperexcitabilité neuronale (Carter, 1962; Reed & Woodbury, 1964; Baran *et al.*, 1987) .

#### **I.5.4.4 Le pH et l'épileptogénèse**

Le pH extracellulaire semble lui aussi jouer un rôle dans la susceptibilité face aux crises épileptiques. En effet, des études réalisées *in vivo* sur des souris déficientes (KO) pour l'anhydrase carbonique, lesquelles présentent une acidose sévère, ont montré que ces animaux étaient moins susceptibles que les témoins de présenter une crise induite par l'administration de divers convulsivants (Velisek & Veliskova, 1994). Ces résultats suggèrent que l'acidification du pH extracellulaire exerce un effet anticonvulsivant, ce qui a été confirmé par des études réalisées *in vitro* au cours desquelles la diminution du pH extracellulaire du milieu perfusé a conduit à l'abolition de décharges épileptiformes induites par une faible concentration de  $Mg^{++}$  (Velisek *et al.*, 1994; Velisek *et al.*, 1996).

#### **I.5.5 LA COMPOSANTE DÉVELOPPEMENTALE**

De nombreuses données épidémiologiques pointent vers une interaction entre le développement cérébral et l'incidence des crises épileptiques. En effet, dans la majorité des cas, l'épilepsie débute précocément au cours du développement cérébral (Epilepsy Foundation of America, 1975; Ellenberg *et al.*, 1984) et la fréquence des crises est cliniquement la plus élevée durant cette période de la vie (Woodbury, 1977; Hauser *et al.*, 1991; Hauser *et al.*, 1993). Durant l'enfance, des attaques épileptiques multiples

peuvent survenir quotidiennement (Van der Berg & Yerushalmy, 1969), accroissant ainsi le risque de présenter un *status epilepticus* (Aicardi & Chevrie, 1970) (état d'activité convulsive constante sans reprise de conscience pendant 30 minutes ou plus (Société Canadienne de Pédiatrie, 1996)). Il semblerait ainsi que le cerveau en cours de développement soit plus susceptible de présenter une crise épileptique qu'à maturité chez l'adulte (Moshe *et al.*, 1983). À l'appui de cette notion, il semble que les mécanismes d'épileptogenèse et de propagation de l'activité épileptique soient, eux aussi, dépendants de l'âge (Moshe, 1987). Certaines études suggèrent ainsi que la neurotransmission excitatrice soit prédominante lors du développement cérébral, permettant ainsi l'apprentissage intense, la plasticité neuronale et la synaptogenèse requises au cours de cette période de la vie (Jensen, 1999). Le cerveau immature serait ainsi relativement hyperexcitable comparativement au cerveau adulte (Moshe, 1987; Jensen, 1999).

Le cerveau immature présente également diverses particularités qui pourraient être à l'origine d'un "déséquilibre" en faveur des systèmes excitateurs plutôt qu'inhibiteurs au cours du développement. Ainsi, durant les jours qui suivent la naissance (jusqu'à P5 chez le rat (Jensen, 1999)), les récepteurs du principal système inhibiteur de neurotransmission, les récepteurs GABA<sub>A</sub> médient un effet dépolarisant au lieu de l'hyperpolarisation typique qui résulte de leur activation chez l'adulte (Yuste & Katz, 1991; Ben-Ari *et al.*, 1994; Ganguly *et al.*, 2001). Cet effet, qui tend à s'inverser graduellement au cours des 3 premières semaines de développement (Palacios *et al.*, 1979; Swann *et al.*, 1989), en opposition au rôle joué par le système GABAergique chez l'adulte, serait dû à une inversion du flux d'ions chlore vers le milieu extra- et non

pas intracellulaire, provoquant de cette façon une dépolarisation membranaire (Chen *et al.*, 1996). Il faut cependant souligner qu'il existe également d'autres indices qui favorisent un rôle inhibiteur de l'innervation GABAergique durant la période précoce du développement cérébral (Agmon *et al.*, 1996; Psarropoulou & Descombes, 1999)

Par ailleurs, le cerveau immature est aussi le siège de certaines particularités du fonctionnement des canaux ioniques comparativement au cerveau adulte. Ainsi la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase y apparaît nettement moins abondante (Haglund & Schwartzkroin, 1990) et la cinétique des canaux rectifiants à délais s'y trouve généralement plus lente (Moody, 1998), deux phénomènes à l'origine de l'allongement de la durée des PA et d'une excitabilité accrue (Jensen, 1999).

De la même manière, on observe également une modification de la densité de jonctions électriques avec le développement cérébral : tandis que de nombreuses expériences ont démontré l'existence d'un couplage électrotonique entre neurones neocorticaux durant la première semaine postnatale chez le rat, ce couplage semble diminuer avec l'âge (Connors *et al.*, 1983; Kriegstein *et al.*, 1987; Rorig & Sutor, 1996) à mesure que la transmission synaptique s'installe. Cette augmentation de la densité de jonctions électriques au cours des premières étapes du développement cérébral pourrait contribuer au faible seuil de déclenchement des crises épileptiques chez l'animal immature (Dudek *et al.*, 1998).

## **I.6 L'ACÉTYLCHOLINE DANS LE CORTEX CÉRÉBRAL ET L'HIPPOCAMPE**

Depuis la découverte des propriétés hypotensives de l'ACh au début des années 1900 par Hunt et Taveau (Hunt & Taveau, 1906), puis la mise en évidence de son rôle de neuromédiateur du SNC une cinquantaine d'années plus tard, les recherches portant sur l'ACh cérébrale et ses propriétés se sont multipliées.

### **I.6.1 L'INNERVATION CHOLINERGIQUE DANS LE CORTEX CÉRÉBRAL ADULTE**

Comparativement aux autres systèmes neuromodulateurs du SNC, l'ACh présente une innervation nettement plus abondante et développée, tant au niveau du néocortex (Mechawar *et al.*, 2000) que de l'hippocampe (Aznavour *et al.*, 2002). Des études histochimiques pour l'acétylcholinestérase (AChE ; l'enzyme de dégradation de l'ACh), des expériences immunohistochimiques pour la choline acetyltransferase (ChAT ; l'enzyme synthétisant l'ACh), des méthodes de traçage rétrograde et antérograde, ou encore l'hybridation *in situ* pour l'ARNm de la ChAT, ont pu établir une cartographie de l'innervation cholinergique à différents stades développementaux. L'histochimie pour l'AChE présente cependant un inconvénient de taille, puisque cette enzyme est également synthétisée par certains neurones non-cholinergiques, tels les neurones dopaminergiques ou noradrénergique (Semba, 2004). L'immunohistochimie anti-ChAT ne disposait, quant à elle, que d'anticorps (Ac) anti-ChAT partiellement efficaces dans la détection de la totalité du réseau cholinergique cérébral (voir

Mechawar *et al.*, 2000; Semba, 2004), jusqu'à la production récente d'un anticorps (Ac) monoclonal dirigé contre l'intégralité de la ChAT cérébrale (Cozzari & Hartman, 1990), rendant dès lors possible une quantification de l'innervation cholinergique cérébrale.

Ainsi, chez le rat adulte, toutes les couches corticales sont cholinergiquement innervées, avec cependant des variations selon les aires et les couches corticales (Lysakowski *et al.*, 1989; Umbriaco *et al.*, 1994; Mechawar *et al.*, 2000). Dans le cortex sensorimoteur, la couche superficielle I présente une innervation cholinergique particulièrement dense, tout comme les couches profondes V et VI. Les couches II et III-IV présentent quant à elles une innervation cholinergique moins dense (Mechawar *et al.*, 2000). Les études portant sur l'ultrastructure des varicosités (terminaisons) axonales ACh ont montré qu'une faible proportion d'entre elles se trouve impliquée dans des relations interneuronales synaptiques. Dans le cortex sensorimoteur, notamment, 10 à 20% d'entre elles seulement forment des complexes de jonction (Umbriaco *et al.*, 1994). Cette donnée suggère un mode de transmission particulier, dit de « transmission diffuse » ou « transmission volumique » en complément de la transmission synaptique classique, ponctuelle et de courte durée.

Cette innervation cholinergique néocorticale est essentiellement composée de neurones cholinergiques extrinsèques, principalement issus du noyau de neurones magnocellulaires du prosencéphale basal (Shute & Lewis, 1963; Krnjevic & Silver, 1965), dans la région correspondant au noyau basalis de Meynert. Ces neurones sont également désignés sous le nom de groupe Ch4 selon la nomenclature proposée par Mesulam *et al.* (1983). Le noyau Ch4 ne contient pas uniquement des neurones

cholinergiques, mais également des neurones et interneurones GABAergiques (Freund & Meskenaite, 1992), ainsi que des neurones probablement glutamatergiques (Gritti *et al.*, 1997). Chez les rongeurs, le cortex contient également des interneurones cholinergiques, qui seraient à l'origine d'environ 20% de ses terminaisons axonales cholinergiques (Eckenstein *et al.*, 1988).

### **I.6.2 L'INNERVATION CHOLINERGIQUE DANS L'HIPPOCAMPE DE RAT ADULTE**

L'innervation cholinergique a également été étudiée qualitativement et quantitativement dans l'hippocampe de rat, à maturité et à divers stades du développement postnatal. Tout comme le néocortex, l'hippocampe présente deux sources d'innervation cholinergique, l'une intrinsèque, l'autre extrinsèque. L'origine principale de l'innervation cholinergique de l'hippocampe est constituée des neurones magnocellulaires du prosencéphale basal, regroupés dans le noyau septal medial et le noyau vertical de la bandelette diagonale de Broca (Rye *et al.*, 1984; Woolf, 1991), qui ont reçu l'appellation Ch1 et Ch2 (Mesulam *et al.*, 1983). Comme dans le néocortex, l'innervation cholinergique hippocampale est particulièrement abondante comparativement à celles d'autres neuromodulateurs, ainsi que l'ont montré Aznavour *et al.* (2002). Ces auteurs ont notamment mesuré la densité des axones et des varicosités cholinergiques en nombre absolu par unité de volume de tissu. Celle-ci s'est avérée particulièrement élevée dans la région CA3 et le gyrus dentelé, où elle surpassait même celle de l'innervation cholinergique corticale (Aznavour *et al.*, 2002). Des interneurones bipolaires, isolés au sein de l'hippocampe, seraient également à l'origine



de 5 à 10% de son innervation cholinergique (Gage *et al.*, 1983; Eckenstein *et al.*, 1988).

La densité relative de l'innervation cholinergique de l'hippocampe souligne l'importance éventuelle de l'ACh dans la facilitation de fonctions tels l'apprentissage (Meissner, 1967; Izquierdo, 1975), la mémoire (Turner, 1969; Eichenbaum, 1999; Maguire, 2001), ou encore l'attention (Oades, 1981), où de nombreuses données expérimentales suggèrent son implication.

### **I.6.3 DÉVELOPPEMENT ONTOGÉNIQUE DE L'INNERVATION CHOLINERGIQUE CÉRÉBRALE**

Diverses études ont pu mettre en évidence un développement précoce de l'innervation cholinergique corticale: les neurones cholinergiques du cerveau antérieur, qui dérivent de l'éminence ganglionnaire du mur télencéphalique embryonnaire, sont générés selon un gradient caudo-rostral. Ces neurones sont parmi les premiers à quitter le cycle mitotique, considéré comme le point d'origine. Ils rejoignent ensuite leur destination finale par migration, et toujours selon un gradient caudo-rostral (E13-E15). Ils émettent ensuite leur axone dès E15-E16 chez le rat, et celui-ci croît rapidement, guidé par chemoaffinité et le contact de guidage vers le cortex cérébral (pour revue Semba, 2004). Les premières fibres atteindraient leur cible corticale dès E18, et seraient régulièrement rejointes par d'autres fibres cholinergiques jusqu'à P14, permettant ainsi l'atteinte des couches corticales plus superficielles. Après les deux premières semaines postnatales, la densité d'innervation cholinergique corticale attendrait ainsi pratiquement les niveaux adultes (Mechawar & Descarries, 2001).

En ce qui à trait au développement de l'innervation cholinergique hippocampale, l'émergence des fibres septo-hippocampales a été détectée dès E15, et celles-ci atteindraient l'hippocampe dès E17 chez le rat (pour revue : Semba, 2004). Les premières fibres cholinergiques sont détectées dans l'hippocampe à P1 (Aznavour *et al.*, sous presse). Tout comme dans le néocortex, on observe un patron d'innervation similaire à celui de l'adulte, bien que de densité légèrement inférieure, dès la deuxième semaine postnatale.

À noter que ni dans le cortex, ni dans l'hippocampe, n'a-t-on observé de surproduction de fibres, ni de varicosités cholinergiques au cours du développement postnatal. De plus, comme chez l'adulte, les terminaisons cholinergiques du cortex et de l'hippocampe en développement présentent une faible incidence synaptique (Mechawar & Descarries, 2001; Aznavour *et al.*, sous presse), suggérant une implication de la transmission diffuse d'ACh au cours de cette période cruciale du développement cérébral comme à maturité.

#### **I.6.4 LES RÉCEPTEURS CHOLINERGIQUES : DISTRIBUTION CORTICALE ET HIPPOCAMPALE**

Qu'elle soit relâchée au niveau des terminaisons axonales asynaptiques ou synaptiques des neurones cholinergiques, l'ACh joue son rôle de neuromodulateur dans le cortex et l'hippocampe grâce à une variété de récepteurs cholinergiques, nicotiques ou muscariniques situés sur les neurones dits cholinocceptifs de ces régions (Schroder *et al.*, 1989; Schroder *et al.*, 1990)

#### I.6.4.1 Les récepteurs nicotiques

Les récepteurs nicotiques cérébraux (nAChR) sont constitués de 5 sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ) dont l'association permet la formation d'un pore transmembranaire. Au niveau de la partie extracellulaire de ces récepteurs, on observe deux sites de fixation pour l'ACh permettant un changement de conformation du récepteur et l'ouverture du pore lors de la liaison de l'ACh. Dans le cerveau, des études de biologie moléculaire ont relevé l'existence d'au moins 10 sous unités  $\alpha$ , et de 4 sous unités  $\beta$  différentes (Tribollet *et al.*, 2004), suggérant dès lors l'existence possible de divers types de nAChR, présentant éventuellement des distributions et des profils développementaux différents. Les sous-unités  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ , et  $\alpha 9$  offrent la capacité de former des nAChR fonctionnels de types homomériques (Elgoyhen *et al.*, 1994; Gerzanich *et al.*, 1994), tandis que les autres sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  se combinent pour former des nAChR hétéromériques fonctionnels (Alkondon *et al.*, 1994; Changeux *et al.*, 1998; Karlin, 2002). Des études neuropharmacologiques ont, de plus, observé différentes cinétiques au niveau des courants nicotiques hippocampaux en patch-clamp (en configuration cellule entière), suggérant ainsi l'existence d'au moins 3 sous-types différents de nAChR au sein de cette région cérébrale (pour revue : Albuquerque *et al.*, 1995). Ces nAChR présentent une large distribution, car ils ont été retrouvés tant en localisation dite « postsynaptique » (dendrites et corps cellulaires neuronaux), que « présynaptique » (terminaisons axonales) (pour revue voir Hogg *et al.*, 2003).

Diverses études autoradiographiques utilisant des ligands sélectifs radioactivement marqués ont permis d'établir la distribution des nAChR homomériques et hétéromériques cérébraux (Clarke *et al.*, 1985; Perry & Kellar, 1995), à divers stades

développementaux (Tribollet *et al.*, 2004). Ainsi, le cortex de rat adulte semble présenter une densité modérée de nAChRs homo- et hétéromériques, avec des variations de densité selon les couches cellulaires. Pour ce qui à trait à l'hippocampe, les nAChR hétéromériques sont exclusivement retrouvés au niveau du *stratum lacunosum-moleculare* de l'aire CA1 et de la couche moléculaire du gyrus dentelé, tandis que les nAChR homomériques, beaucoup plus denses dans la formation hippocampale, sont situés au niveau de la couche polymorphe du gyrus dentelé, et dans une moindre mesure, dans toutes les couches de l'aire CA3 (Tribollet *et al.*, 2004). Ces deux types de nAChR sont retrouvés à P1 chez le rat avec une distribution et une densité cérébrales comparables à celles observées chez le rat adulte, sauf dans l'hippocampe, le cortex cérébral et le tronc cérébral (Tribollet *et al.*, 2004). En effet, dans le cortex de rat, les nAChR homomériques présentent une distribution colonnaire dense dès P1, mais hétérogène jusqu'à P15, tandis que les nAChR hétéromériques, particulièrement abondants dans la couche IV chez le rat adulte, sont plutôt concentré dans la couche VI chez le rat nouveau-né. Dans l'hippocampe, la densité de radioliation aux nAChR hétéromériques est similaire chez le rat adulte et nouveau-né ; les nAChR homomériques sont, jusqu'à P13, principalement situés dans l'aire CA1, d'où ils sont absents à l'âge adulte (Tribollet *et al.*, 2004).

#### **I.6.4.2 Les récepteurs muscariniques**

Les récepteurs muscariniques (mAChR) cérébraux font quant à eux partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) (Hulme, 1990). Les méthodes de clonage moléculaire ont permis de démontrer l'existence de 5 sous-types différents

de mAChR (M1-M5), produits par 5 gènes différents (m1-m5), bien qu'homologues. La densité d'expression de ces mAChR est modérément abondante au niveau cérébral, en particulier dans le cortex et l'hippocampe (chez le rat : ~ 1000fmol mAChR/mg protéine) (Cortes & Palacios, 1986; Spencer *et al.*, 1986). La détection autoradiographique de ces différents sous-types de mAChRs ayant montré ses limites, en raison de la trop faible sélectivité des divers ligands, la cartographie cérébrale des divers sous-types de mAChR a pu être établie grâce aux techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie.

D'une façon générale, les mAChR cérébraux principalement retrouvés au niveau cérébral sont les m1, m2, m4, tandis que m3 et m5 y sont exprimés beaucoup plus faiblement (Levey *et al.*, 1991) (les m5 représentant moins de 1% des mAChR, dans toutes les aires cérébrales étudiées (Tice *et al.*, 1996)). Dans le néocortex, les expériences d'immunocytochimie ont mis en évidence une distribution fortement laminée des mAChRs (Van der Zee & Luiten, 1999). Des m1 ont été mis en évidence au niveau de dendrites et d'épines postsynaptiques de cellules pyramidales, dans toutes les couches corticales, et tout particulièrement les couches II/III et VI, tandis que les m2 sont rapportés présynaptiquement, sur les terminaisons et corps cellulaires des interneurons de la couche IV, et sur le bord de la couche V/VI (Levey *et al.*, 1991). m1 et m2 étant associés à des complexes synaptiques asymétriques ou symétriques (Mrzljak *et al.*, 1993), ces mAChR pourraient moduler à la fois la transmission excitatrice glutamatergique, et la transmission cholinergique dans le cortex. Les m4 sont pour leur part retrouvés au niveau des couches corticales II/III et IV (Levey *et al.*,

1991). La proportion représentée par chacun de ces mAChR corticaux est estimée à 40%, 37%, 15% respectivement pour m1, m2, m4 (Levey *et al.*, 1991).

Dans l'hippocampe, m1 est exprimé sur les corps cellulaires du *stratum pyramidale* et sur leurs dendrites basales et apicales dans les *stratum oriens* et *radiatum* (Levey *et al.*, 1995). m2 se retrouve principalement sur des neurones non-pyramidaux (Levey *et al.*, 1995), tandis que m3 a essentiellement été détecté sur les neurones pyramidaux du *stratum lacunosum-moleculare*. m4 a été retrouvé dans les neurones pyramidaux, ainsi qu'au niveau de fibres, de la fimbria et de la commissure hippocampale. Certains des récepteurs m2 et m4 se situeraient également en « présynaptique » : les m2 sur des axones cholinergiques et les m2 et m4 sur d'autres terminaisons axonales, non cholinergiques, suggérant à la fois un rôle d'autorécepteur et d'hétérocepteur axo-terminal (Levey *et al.*, 1995). Dans l'hippocampe, l'importance relative des différents mAChRs est de 36, 33 et 27% respectivement pour m1, m2 et m4. Bien que les m3 soient présents en faible densité, comparativement aux autres mAChRs, le cortex et l'hippocampe représentent les zones cérébrales où ce mAChR présente les plus hautes densités d'expression (Levey *et al.*, 1994).

D'un point de vue développemental, les études de radioliation effectuées sur membranes par Tice *et al.*, chez des rats âgés de P16-P90, ont montré des variations en fonction de l'âge de la densité et de l'affinité des divers sous types de mAChR dans diverses régions. En effet, l'utilisation de l'agoniste non-spécifique N-methylscopolamine a mis en évidence, une augmentation du nombre de mAChR, entre P16 et P21-90, dans le cortex et l'hippocampe, sans modification de l'affinité dans ces deux régions. Les études d'immunoprécipitation, employant des anticorps (Ac) sélectifs pour

chacun des sous types de mAChR, ont en revanche permis d'observer des modifications significatives de leurs niveaux d'expressions en fonction de l'âge. Dans le cortex, tout comme l'hippocampe, il a notamment été relevé que l'expression de m1 augmentait significativement entre P16 et P21, puis diminuait significativement entre P21 et P90, tandis que les m2 et m4 présentent des profils d'expression augmentant légèrement et régulièrement tout au long du développement cortical et hippocampal. Les m3 y demeurent quant à eux à un niveau d'expression relativement stable tout au long du développement, quoiqu'en très faible augmentation (Tice *et al.*, 1996).

De la même façon, Aubert *et al.* (1996) ont quantifié par autoradiographie la densité de radioliation aux mAChR sur des coupes provenant de rats âgés de 18 jours embryonnaires (ED18) à 60 jours postnatals (P60). Ces expériences ont démontré que, dès la troisième semaine postnatale, les mAChR M1 et M3 atteignent, dans le cortex et l'hippocampe, des densités comparables à celles relevées chez l'adulte. La densité des mAChR M2, en revanche, ne rejoint les niveaux adultes que lors de la cinquième semaine postnatale dans ces deux régions (Aubert *et al.*, 1996).

Les expériences immunocytochimiques non sélectives pour le sous type de mAChR, menées par Buwalda *et al.* (1995) sur des rats âgés de P1 à P21 ont par ailleurs démontré une très forte densité de mAChR dans le cortex somatosensoriel immature, et des mécanismes de transport de ces récepteurs du corps cellulaire des cellules pyramidales vers les prolongements dendritiques et axonaux. De cette façon, on observe une forte densité de mAChRs dans la couche corticale I, lors des premiers stades développementaux postnatals. À mesure que les mAChR sont dirigés vers les

prolongements dendritiques et axonaux, cette couche présente une densité de mAChR décroissante, jusqu'à être particulièrement faible à P21 (Buwalda *et al.*, 1995).

De façon plus globale, l'hippocampe comme le cortex cérébral, semble présenter une densité supérieure de mAChR comparativement à celle des nAChR (Van der Zee *et al.*, 1992).

### **I.6.5 LES MÉCANISMES D'ACTION BIOCHIMIQUES DES RÉCEPTEURS MUSCARINIQUES**

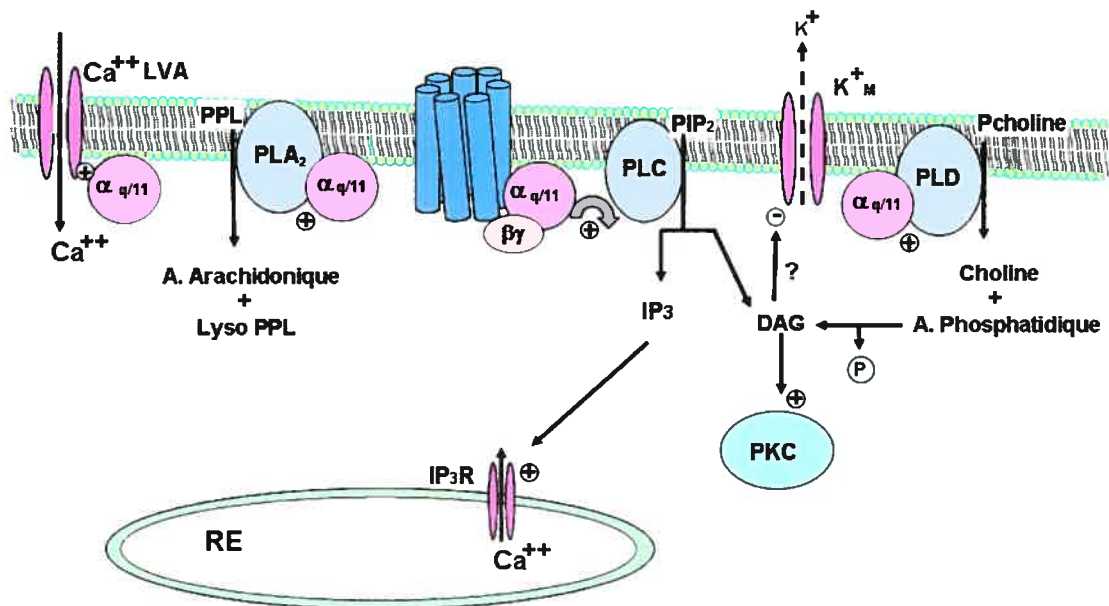
La réponse physiologique générée par une stimulation de mAChR correspond à une cascade d'interactions protéiques, avec notamment l'activation d'une protéine G, suivie de la stimulation ou l'inhibition d'une enzyme ou d'un canal effecteur (Felder, 1995). La réponse biologique observée par suite de la stimulation de mAChR dépend d'un grand nombre de facteurs, incluant la zone cérébrale, la localisation pré- ou postsynaptique de ce mAChRs, le sous-type de mAChR, ainsi que toute la cascade de transduction de signaux propre à la cellule. Selon le mAChR qui est activé par un ligand cholinergique donné, le type de protéine G activée lors du changement de conformation du mAChR sera différent. Ainsi, la stimulation de M1, M3 ou M5 active la sous-unité  $\alpha$  des protéines Gq ou G<sub>11</sub> (Loffelholz, 1996) (insensibles à la toxine pertussis, PTX), tandis que M2 et M4 sont couplés à la sous-unité  $\alpha$  et/ou au dimère  $\beta\gamma$  des protéines G<sub>i</sub> (Offermanns *et al.*, 1994; Hosey *et al.*, 1996) et G<sub>o</sub> (Hosey *et al.*, 1996) (sensibles à la PTX).

L'activation des sous-types muscariniques M1, M3 et M5 conduit généralement à des effets excitateurs, via l'activation de la phospholipase C (PLC) (Hulme, 1990), la

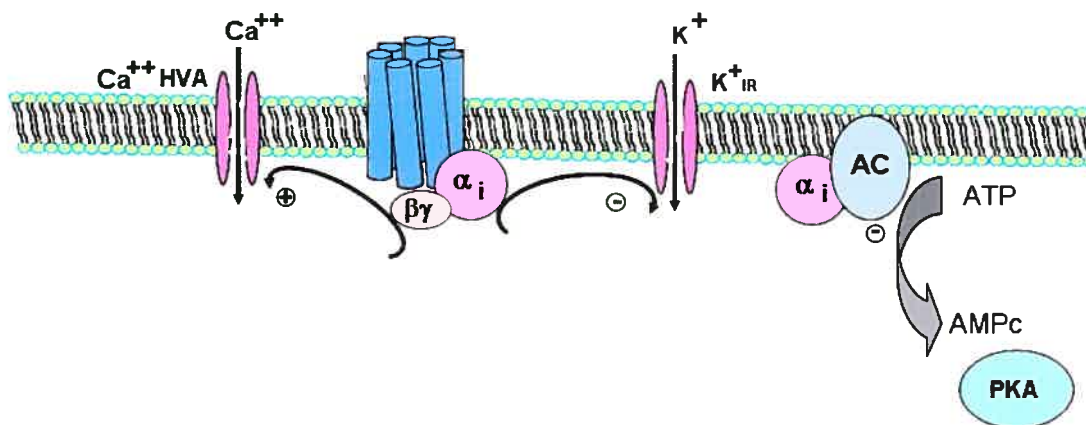


phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Tence *et al.*, 1994), la phospholipase D (PLD) (Singer-Lahat *et al.*, 1996), et l'augmentation des influx Ca<sup>++</sup> (Toselli and Lux 1989), ainsi que l'inhibition des courants K<sup>+</sup><sub>M</sub> (Brown *et al.*, 1997) (Figure 5A). Quant à l'activation des M2 et M4, elle génère plutôt des effets inhibiteurs, dont l'inhibition de l'adénylyl cyclase (AC) (Hulme, 1990), l'activation des canaux K<sup>+</sup> rectifiants entrants (K<sup>+</sup><sub>ir</sub>) (Brown *et al.*, 1997), l'inhibition d'influx Ca<sup>++</sup> (Toselli & Lux, 1989), et dans quelques cas, un faible couplage activant la PLC (Katz *et al.*, 1992) (Figure 5B, pour revue Caulfield, 1993; Felder, 1995).

A



B



**Figure 5 : Cascades intracellulaires déclenchées par l'activation des récepteurs muscariniques M1, M3 et M5 (A) ou M2 et M4 (B).**

PPL, phospholipides ; LysoPPL, lysophospholipides ; Pcholine, phosphatidylcholine.

### **I.6.5.1 L'activation des récepteurs muscariniques M1, M3 et M5**

L'activation de la PLC $_{\beta 1}$  par les récepteurs M1, M3 et M5 catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP $_2$ ) en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG) (Liu & Wu, 2004). Cette relâche intracellulaire d'IP3 entraîne l'activation des récepteurs IP3 situés à la surface du reticulum endoplasmique lisse, et provoque une mobilisation du calcium depuis ces stocks intracellulaires vers le cytoplasme. Le DAG active, quant à lui, la protéine kinase C (PKC) (Exton, 1994), laquelle, en aval, phosphoryle de nombreuses protéines. Les M2 ou M4 peuvent activer la PLC, lorsqu'ils sont exprimés à des niveaux particulièrement élevés, auquel cas il s'agirait de la PLC $_{\beta 2}$  (Katz *et al.*, 1992).

L'activation de la PLA $_2$  et celle de la PLD par les M1, M3 et M5 ont toutes deux pour caractéristiques d'être Ca $^{++}$ - dépendantes. Pour cette raison, il a été suggéré que ces récepteurs M1, M3 et M5 soient associés à un canal Ca $^{++}$  soumis à leur influence, qui présenterait une faible conductance et une indépendance du voltage (Singer-Lahat *et al.*, 1996). L'activation de la PLA $_2$  catalyse l'hydrolyse des acyl situés en position sn-2 sur les phospholipides membranaires, permettant ainsi la relâche de lysophospholipides et d'acide arachidonique. Ce dernier est impliqué dans diverses fonctions de régulation des canaux ioniques, de systèmes de seconds messagers, de l'expression génétique et de la relâche et recapture de divers neurotransmetteurs (pour revue Lautens *et al.*, 1998).

L'activation de la phospholipase D, quant à elle, catalyse l'hydrolyse de la phosphatidylcholine, libérant de la choline et de l'acide phosphatidique, ce dernier étant, dans un second temps, déphosphorylé en DAG (Loffelholz, 1996).

Les mAChR peuvent également inhiber les courants  $K^+_M$  via l'activation de M1, M3, et M5, un effet qui pourrait être médié par le DAG issu de l'activation de la PLC. L'inhibition de ce courant potassique sortant tend à créer un état d'hyperexcitabilité neuronale qui facilite les décharges de pics répétitifs (Brown *et al.*, 1997).

Dans des cultures de neurones hippocampaux embryonnaires, il a par ailleurs été démontré que l'ACh activait les courants  $Ca^{++}$  activés à bas-voltage (LVA), via une protéine-G insensible à la PTX (Toselli & Lux, 1989).

#### **I.6.5.1 L'activation des récepteurs muscariniques M2 et M4**

Les M2 et M4 vont, pour leur part, principalement inhiber l'activité de l'AC, et la formation subséquente d'adenosine monophosphate cyclique (AMPC). Ceci aura pour conséquence d'inhiber l'activation de la PKA et la phosphorylation qu'elle catalyse sur des récepteurs  $Ca^{++}$  voltage-dépendants. Diverses études ont ainsi montré une suppression des courants  $Ca^{++}$  somatiques activés à haut voltage, tels les courants de types N et P/Q (Shapiro *et al.*, 2000), via l'activation de mAChR.

Par ailleurs, il a été rapporté que les M2, via le dimère  $\beta\gamma$  d'une protéine  $G_{i3}$ , peuvent activer la  $PI_3$ -kinase, qui est à l'origine d'une cascade d'activation de messagers intracellulaires aboutissant à l'activation de la  $PLA_2c$  (Zhou *et al.*, 2003).

De plus, l'activation des récepteurs M2 et M4 pourrait entraîner l'ouverture de canaux  $K^+_{ir}$ , un effet inhibiteur qui semblerait directement médié par le dimère  $\beta\gamma$  libéré de la protéine  $G_i$  activée (Brown *et al.*, 1997).

L'implication de ces récepteurs dans l'inhibition de courants  $Ca^{++}$  activés à haut-voltage (HVA) a aussi été démontrée, dans des cultures de neurones hippocampaux

embryonnaires. L'ACh y inhiberait ces courants HVA via un mécanisme impliquant une protéine-G sensible à la PTX (Toselli & Lux, 1989).

Tous ces effets muscariniques représentent des mécanismes de modulation de la transmission neuronale et, par voie de conséquence, peuvent conduire à une modulation de l'activité épileptiforme.

#### **I.6.6 LES EFFETS DE L'ACTIVATION MUSCARINIQUE DANS LE CORTEX ET L'HIPPOCAMPE**

Dans le cortex et l'hippocampe, la localisation pré- ou postsynaptique des mAChRs a permis l'observation d'une grande variété d'effets sur l'activité neuronale.

Dans les deux régions, la libération d'ACh aurait un effet facilitateur sur la synchronisation des décharges neuronales. Cole et Nicoll (1984) ont ainsi montré une augmentation muscarinique des potentiels post-synaptiques excitateurs lents (slow EPSPs) évoqués par stimulation du *stratum oriens* et enregistrés intracellulairement en CA1. Pitler et Alger (1992) ont quant à eux rapporté une diminution de l'amplitude des EPSP et des IPSP GABAergiques évoqués, parallèlement à l'induction d'IPSP spontanés, lors d'enregistrements intracellulaires en CA1. Ces résultats, renversés par un antagoniste non sélectif mAChR, suggèrent des inputs muscariniques sur les interneurons GABAergiques projetant par la suite sur les cellules pyramidales de l'hippocampe (Pitler & Alger, 1992).

De nombreuses études ont par ailleurs démontré que l'activation des mAChR était à l'origine d'une dépolarisation neuronale postsynaptique, notamment dans l'hippocampe (Pitler & Alger, 1990) et le néocortex (McCormick & Prince, 1986). Il n'existe pas,

pour l'heure, de consensus concernant le(s) type(s) de mAChR impliqué(s), mais cette dépolarisation postsynaptique, ainsi que l'augmentation de l'excitabilité neuronale, pourraient être la conséquence d'une diminution muscarinique de la conductance  $K^+$  (Krnjevic *et al.*, 1971)

Sur le versant présynaptique, les mAChR inhibent la relâche de neurotransmetteurs, mais régulent également la libération de l'ACh elle-même. Il a ainsi été démontré qu'un agoniste mAChR, non sélectif pour le sous type muscarinique, inhibait la relâche d'ACh dans des tranches d'hippocampe. Cet effet ne semble pas médié par les M1, les antagonistes M1 n'ayant que peu ou pas d'effet sur cette inhibition de la relâche d'ACh (Pohorecki *et al.*, 1988). De nombreuses expériences électrophysiologiques tendent à indiquer que M2 serait le mAChR responsable de cette autorégulation cholinergique, ce qui corroborerait la localisation des M2 sur les terminaisons cholinergiques axonales dans le cortex, tout comme dans l'hippocampe (Levey *et al.*, 1995). Outre ces effets d'autorégulation muscarinique, il a également été rapporté une modulation muscarinique présynaptique de la relâche GABAergique dans le striatum (Raiteri *et al.*, 1990), de la relâche glutamatergique dans l'hippocampe (Marchi & Raiteri, 1989) et le cortex (Calabresi *et al.*, 1998), et de la relâche noradrénergique dans le striatum et la substance noire (Marchi *et al.*, 1991). Dans ces diverses régions, tandis que l'activation mAChR tend à augmenter la relâche dopaminergique via M1, les relâches de GABA et de glutamate sont quant à elles inhibées par un mécanisme impliquant M2 (pour revue : Caulfield, 1993).

### I.6.7 LA RÉGULATION DES RÉCEPTEURS MUSCARINIQUES

Comme tous les récepteurs couplés aux protéines-G (GPCRs), les mAChR sont sujets à de nombreuses régulations, induites par des mécanismes très divers.

D'une part, tous les GPCRs, et donc les mAChR, présentent un ou plusieurs sites de fixation allostérique (Tucek & Proska, 1995). Ainsi, la fixation d'un ligand allostérique sur un mAChR, quel que soit son sous-type, est à l'origine d'un changement de conformation du mAChR, modifiant l'affinité de celui-ci envers ses ligands classiques (orthostériques), en la diminuant, ou au contraire, en l'augmentant (pour revue : Van Koppen & Kaiser, 2003).

En outre, les mAChR peuvent former des homo- et hétérodimères et oligomères au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et/ou au niveau membranaire, via des liaisons non-covalentes, ou covalentes, comme les ponts disulfides mis en évidence au sein de dimères et oligomères M3 (Zeng & Wess, 1999). Certaines controverses persistent cependant, en rapport avec une éventuelle hétérodimérisation M2/M3 (Maggio *et al.*, 1999; Zeng & Wess, 1999). La conséquence fonctionnelle de cette formation d'oligomères n'est pas connue à l'heure actuelle, mais pourrait être à l'origine de certains effets inattendus des mAChR (Van Koppen & Kaiser, 2003).

Un mécanisme de régulation des mAChR par désensibilisation a également été mis en évidence. Ce phénomène peut être induit par la présence d'un agoniste cholinergique, mais il peut également se produire en l'absence d'agoniste. En effet, la désensibilisation des mAChR fait intervenir des phosphorylations au niveau des résidus sérine et thréonine de la 3<sup>ème</sup> boucle cytoplasmique et de l'extrémité C terminale de ces récepteurs, découplant ainsi le récepteur de sa protéine G (van Koppen & Kaiser,

2003). Diverses enzymes peuvent phosphoryler les mAChRs de cette façon, notamment les GPCR kinases (GRKs), la PKC et la caséine kinase. Tandis que les GRKs ne phosphorylent que les mAChR liés à un agoniste, mettant ainsi fin au signal cholinergique (Van Koppen & Kaiser, 2003), la PKC quant à elle, phosphoryle les M1 et M3, indépendamment de la présence de l'agoniste (Haga *et al.*, 1996). Les GRKs pourraient également induire une désensibilisation des GPCRs par interaction directe avec la protéine G, et sans phosphorylation du GPCR (Dicker *et al.*, 1999).

De plus, l'activation cholinergique prolongée des mAChR produit une internalisation de ces récepteurs, notamment médiée par les GRKs et la fixation de  $\beta$ -arrestine sur le récepteur phosphorylé (pour revue Caulfield, 1993; Van Koppen & Kaiser, 2003). Ce phénomène d'internalisation conduit ainsi à la diminution du nombre de mAChRs disponibles sur la membrane neuronale.

Il a par ailleurs été démontré que les M2 et M4 présynaptiques présentaient différents niveaux d'affinité envers leur agoniste en fonction du potentiel membranaire. En effet, tandis qu'au potentiel de repos membranaire ( $V_M$ ), ces mAChR fixent leur agoniste avec une haute affinité, ils sont en état de faible affinité en condition de dépolarisation (Linial *et al.*, 1997; Ilouz *et al.*, 1999). Cependant, le mécanisme de ce changement d'affinité demeure inconnu.

Enfin, lors de mise en présence prolongée avec un antagoniste mAChR, diverses études ont relevé une régulation à la hausse du nombre de mAChR membranaires, notamment dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Dans ces deux régions, il a par ailleurs été démontré que cette régulation à la hausse était variable selon le sous-type de mAChR concerné (Wall *et al.*, 1992). Selon les expériences de Wall *et al.*, en effet,



l'administration chez le rat d'un antagoniste non sélectif durant 14 jours entraîne une augmentation des densités cortico-hippocampales de M3 et M5 de 69 et 65% respectivement, tandis que celles de M1, M4 et M2 sont respectivement augmentées de 19, 11, et 9%.

Enfin, les mAChR exprimant diverses caractéristiques endogènes selon leur localisation au sein de cellules polarisées, comme les neurones, il a été suggéré que la distribution intracellulaire des mAChR puisse également être régulée (Van Koppen & Kaiser, 2003). De cette façon, des mécanismes de redistribution de mAChR cérébraux entre les divers compartiments neuronaux peuvent être envisagés.

### **I.6.8 ACÉTYLCHOLINE ET ÉPILEPSIE**

En fonction de l'aire cible, de la localisation pré- ou postsynaptique, du sous-type, et de la cascade intracellulaire subséquente, les mAChR vont ainsi pouvoir moduler une très grande variété de fonctions ou d'états cérébraux. De nombreux indices pointent notamment vers une relation multilatérale entre l'état d'activation muscarinique et l'activité épileptiforme.

Les expériences de kindling électrique hippocampal menées *in vivo* par Ferencz *et al.* (1997 ; 2001) suggèrent que le système cholinergique joue un rôle protecteur face aux crises épileptiques. En effet, une dénervation cholinergique sélective par lésion du prosencéphale basal entraîne un abaissement du seuil de déclenchement des crises et une sévérité accrue de celles-ci. En revanche, Turski *et al.* (1983) ont montré que des microinjections d'agonistes cholinergiques exogènes dans l'amygdale ou l'hippocampe dorsal de rat engendrait la survenue de crises limbiques soutenues et de dommages

cérébraux, ce qui sous tendrait un rôle facilitateur du système cholinergique. De la même manière, lors de l'injection aigüe d'un convulsivant, la pilocarpine, chez des souris génétiquement déficientes (KO) pour M2, M3, M4 ou M5, il a été relevé que toutes les souris présentaient *in vivo* des crises avec une mortalité similaires à celles des souris contrôles (Bymaster *et al.*, 2003). En revanche, les souris KO M1 ne montraient aucun signe de crise (Hamilton *et al.*, 1997; Bymaster *et al.*, 2003), même à de très hautes doses (jusqu'à 300mg/kg, en sous-cutané). Ceci suggérerait l'implication du seul sous-type M1 dans la facilitation des crises, et son rôle de premier plan dans leur initiation.

Par ailleurs, dès 1971, Ferguson et Jasper ont réalisé une étude corticale laminaire *in vitro* des paroxysmes épileptiformes induits par l'application corticale d'ACh chez le chat (Ferguson & Jasper, 1971). Sutor et Hablitz (1989) ont, pour leur part, observé *in vitro* une modulation muscarinique de l'activité épileptiforme dans le cortex de rat en cours de développement. En effet, lors d'enregistrements intracellulaires de neurones corticaux de la couche II/III, l'application d'agoniste mAChR démontrait un effet inhibiteur sur les décharges épileptiformes induites par la PTX, à savoir l'élévation du seuil d'évocation des potentiels épileptiformes. Il pourrait s'agir d'un effet présynaptique, compte tenu de la présence de mAChRs sur les terminaisons synaptiques excitatrices corticales (Vizi, 1979; Vogt, 1984). Parallèlement à cela, l'ACh présentait également un effet facilitateur, observé sous la forme d'une modification des propriétés membranaires intrinsèques, conduisant à un abaissement du seuil de déclenchement des PA et à une augmentation de la fréquence de décharges

(Sutor & Hablitz, 1989). Les expériences électrophysiologiques menées *in vitro* par Psarropoulou *et al.* avec un modèle épileptiforme de désinhibition GABA<sub>A</sub> chez le rat immature (Psarropoulou & Dallaire, 1998; Gruslin *et al.*, 1999) et adulte (Gruslin *et al.*, 1999) ont pour leur part démontré une médiation de cette activité épileptiforme par les mAChRs dans l'hippocampe. Par ailleurs, les résultats obtenus avec un agoniste cholinergique exogène et une anti-AChE étant similaires, les niveaux d'ACh endogène semblent être suffisants pour jouer ce rôle de médiation des crises (Psarropoulou & Dallaire, 1998; Gruslin *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent un rôle facilitateur de l'ACh dans la médiation de l'épileptogénèse, parallèlement à un effet protecteur, inhibiteur. Effectivement, en condition de désinhibition, une diminution de l'amplitude de l'activité évoquée électriquement est observée, parallèlement à une augmentation de la fréquence de décharges épileptiformes spontanées (Psarropoulou & Dallaire, 1998; Gruslin *et al.*, 1999). D'après les résultats obtenus avec les antagonistes mAChRs sélectifs, ces deux effets seraient principalement médiés par M2 (Psarropoulou *et al.*, 1998).

Diverses études ont également suggéré que les crises convulsives puissent avoir des conséquences au niveau cérébral, et notamment sur le système cholinergique, impliquant de ce fait une relation bidirectionnelle entre système cholinergique et crises épileptiques. Mingo *et al.* ont ainsi mesuré, par hybridation *in situ*, une diminution des niveaux d'expression des M1 et M3, à la suite d'une crise généralisée induite par injection intrapéritonéale (IP) d'acide kaïnique (KA) (Mingo *et al.*, 1997). Par ailleurs, Aronstam *et al.* ont rapporté un nombre accru de mAChRs dans l'hippocampe de souris

génétiqnement sensibles aux crises audiogéniques comparativement aux souris normales (Aronstam *et al.*, 1979), suggérant que ce nombre élevé de mAChRs soit à l'origine de la sensibilité accrue aux crises audiogéniques. Les expériences menées sur des rats ayant subi des convulsions induites par injection de PTZ lors de leur développement, ont montré, à l'âge adulte et en présence d'antiAChE (mais en absence de désinhibition), des décharges épileptiformes spontanées dans l'aire CA3, absentes chez les rats normaux (Meilleur *et al.*, 2000). Des études complémentaires de cytochimie et de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), couplée à une ionisation de type électrospray, ont pour leur part démontré chez ces mêmes animaux, l'absence de différences par rapport aux concentrations témoins de GABA et d'ACh, ni de la densité de l'innervation cholinergique (Meilleur *et al.*, 2003). Aucune perte cellulaire n'ayant pu être rapportée par suite d'une crise induite par injection unique de PTZ (et ce quel que soit l'âge postnatal de l'animal) (Nehlig & Pereira de Vasconcelos 1996; Pineau, 1999), ces observations suggèrent l'implication d'un changement permanent des mAChRs provoqué par une crise convulsive en bas âge.

## **I.7 LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX DE CRISES**

### **I.7.1 LES DIFFÉRENTS MODÈLES ANIMAUX DE CRISES**

#### **ÉPILEPTIQUES *IN VIVO***

La grande majorité des connaissances actuelles sur les mécanismes fondamentaux de l'épilepsie provient d'expériences réalisées à l'aide de modèles expérimentaux animaux. *In vivo*, différents types de crises épileptiques peuvent ainsi être produits par

divers types de procédures (Kubova & Moshe, 1994; Velisek *et al.*, 1995). Bien que les modèles épileptiques, ou de crises épileptiques, soient très nombreux, quelques-uns seulement sont couramment employés dans le cadre d'études pharmacologiques (Loscher, 2002).

Des crises généralisées, tonico-cloniques, peuvent ainsi être induites chez l'animal électriquement (électrochocs maximaux) ou chimiquement (pentylentetrazole et autres antagonistes GABA ; inhibiteurs de la synthèse de GABA ; agonistes inverses du site benzodiazepine du récepteur GABA; antagonistes glycinergiques; autres convulsivants) (Kubova & Moshe, 1994). Chez le rongeur, ces crises généralisées tonico-cloniques présentent des caractéristiques diverses en fonction du stade de développement de l'animal et de l'efficacité variables des divers agents convulsivants (Kubova & Moshe, 1994).

Le modèle d'électrochocs maximaux consiste en l'administration d'un courant électrique d'une fréquence d'environ 60Hz via des électrodes cornéennes. Ceci provoque des extensions des membres inférieurs chez plus de 97% des animaux (Wallace *et al.*, 2001). Cette procédure est très couramment employée pour tester l'efficacité antiépileptique de composés potentiellement anticonvulsivants (Karler *et al.*, 1974; Wallace *et al.*, 2001). En effet, les drogues abolissant les extensions des membres inférieurs évoquées par les électrochocs sont généralement efficaces dans le traitement des crises généralisées tonico-cloniques et des crises partielles (Wallace *et al.*, 2001).

Le modèle de crises généralisées induites par l'administration systémique de pentylentetrazole (PTZ) représente le modèle le plus employé de crises généralisées induites chimiquement (Loscher *et al.*, 1991; Kubova & Moshe, 1994). Il comporte à la fois la  $CD_{50}$  (dose induisant des crises chez 50% des animaux testés) la plus faible et le déclenchement le plus rapide des crises au cours des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> semaines postnatales chez le rat (Velisek *et al.*, 1992). Le PTZ est un bloqueur du complexe  $GABA_A$  (Olsen, 1981; Macdonald & Olsen, 1994), qui agit en se fixant sur son site picrotoxine (Ramanjaneyulu & Ticku, 1984; Squires *et al.*, 1984) pour empêcher l'entrée d'ions chlore et l'hyperpolarisation résultante. Cet effet est contraire à ce que suggérait une étude antérieure, pointant le site benzodiazépine de ce récepteur (Rehavi *et al.*, 1982). Le PTZ est rapidement absorbé par l'organisme et induirait le même effet à une dose donnée chez l'animal adulte ou âgé de 20 jours postnataux (Haberer & Pollack, 1991). Sa demie-vie est relativement courte dans le cerveau de rongeur (2.5-3.8h) (Esplin & Woodbury, 1956; Vohland & Koransky, 1972) et ses effets disparaissent du tracé EEG 24h après son administration (Halonen *et al.*, 1992).

L'administration systémique de la picrotoxine induit, pour sa part, des crises comparables à celles générées par l'administration de PTZ (Velisek *et al.*, 1995), avec cependant une latence nettement supérieure préalablement à l'initiation des crises (Veliskova *et al.*, 1990; Velisek *et al.*, 1995). D'autres antagonistes du récepteur  $GABA_A$  sont utilisés en tant que modèles animaux de crises généralisées, notamment la bicuculline (BMI) (Zouhar *et al.*, 1989) (antagonisme compétitif) et la pénicilline (Weiss & Hablitz, 1984) (antagonisme partiel). Par ailleurs, des crises absences peuvent être modélisées chez l'animal de façon chimique (e.g GABA, faibles doses de PTZ

systemique, pénicilline (Kubova & Moshe, 1994)) ou génétiquement (rats génétiquement modifiés GAERS, présentant spontanément des crises absences et caractérisés par des décharges pointe-onde à l'EEG, dans les réseaux thalamo-corticaux (Vergnes *et al.*, 2001)).

D'autres modèles font pour leur part intervenir des inhibiteurs de la synthèse GABAergique, qu'il s'agisse d'inhibiteurs compétitifs de l'activité glutamate décarboxylase, tel l'acide 3-mercaptopropionique (3-MPA) (Mares *et al.*, 1993), ou d'antagonistes non-compétitifs (hydrazides et allyglycine, par exemple (Meldrum *et al.*, 1979)). De la même façon, l'administration d'agonistes inverses du site benzodiazépine du récepteur GABA<sub>A</sub>, comme l'imidazothienodiazépinone, diminuerait le seuil critique des crises induites par l'administration d'autres convulsivants (Lister & Durcan, 1989) ou serait directement à l'origine de convulsions (Vergnes *et al.*, 2001). Le rôle convulsivant des antagonistes glycinergiques a également été relevé, notamment concernant la brucine (Kubova & Moshe, 1994) et surtout la strychnine (Gilman *et al.*, 1990), laquelle induit des crises généralisées tonico-cloniques complètes durant la première semaine postnatale chez le rat. Enfin, un certain nombre de substances autres ont également démontré des propriétés facilitant la génération de convulsions, ainsi que l'illustre l'inhalation de flurothyl dont les mécanismes d'action demeurent inconnus (Velisek *et al.*, 1995)

Les crises focales ont pu être modélisées chez l'animal par l'administration de drogues convulsivantes à la surface du cortex cérébral (BMI, kaïnate, strychnine, atropine, pénicilline, PTZ, acide quinolinique (Kubova & Moshe, 1994)) ou par

stimulation électrique des structures limbiques (Maresova *et al.*, 1988; Kubova & Moshe, 1994)

La multitude de modèles épileptiques existant à ce jour autorise ainsi le choix du modèle approprié selon de nombreux critères, tels le type de crise étudié, le stade développemental de l'animal, la biodisponibilité de la substance convulsivante, son mécanisme d'action, ou encore sa toxicité.

### **I.7.2 LES MODÈLES D'ACTIVITÉ ÉPILEPTIQUE SUR TRANCHES**

La multiplication des expériences réalisées *in vitro* sur tranches cérébrales au cours des dernières décennies a permis de répondre à de nombreuses interrogations concernant les mécanismes cellulaires engagés lors des crises épileptiques. Ces préparations sous forme de tranches ont en effet l'avantage d'offrir des conditions d'enregistrement stables, le contrôle de la composition du milieu extracellulaire, l'absence de substances anesthésiantes, et l'accès facilité aux cellules des substances administrées (Misgeld, 1992).

L'hippocampe, en particulier, présente des caractéristiques d'organisation particulièrement propices à cette préparation, de par son organisation laminaire et lamellaire : ainsi, des tranches réalisées perpendiculairement à l'axe longitudinal de cette structure contiendront à la fois les voies perforantes afférentes et les connexions intrahippocampales (Misgeld, 1992). De plus, les enregistrements électrophysiologiques intracellulaires y sont facilités par le regroupement et



l'alignement des corps cellulaires des cellules principales (eg : cellules pyramidales et granulaires).

Les expériences sur tranches néocorticales ont pour leur part débuté dans les années 1980, avec les études de Connors et al. portant sur les propriétés synaptiques et cellulaires des neurones corticaux (Connors *et al.*, 1982). Depuis lors, les nombreuses études réalisées dans cette préparation ont permis d'identifier les propriétés morphologiques et électrophysiologiques des neurones néocorticaux, ainsi que certaines de leurs propriétés intrinsèques (Deisz, 1982)

La plupart des données actuelles sur les mécanismes cellulaires épileptogènes proviennent des études *in vitro* sur tranches d'hippocampe de rongeur, alors que les échantillons épileptiques prélevés lors de la chirurgie chez l'homme sont principalement d'origine néocorticale. De ce fait, les expériences *in vitro* sur tranches néocorticales de rongeur se sont révélées essentielles à l'interprétation et à la généralisation des données obtenues sur l'hippocampe de rongeur, en rapport avec celles qui proviennent des échantillons humains.

## **I.8 OBJECTIFS DE RECHERCHE**

Au cours de cette thèse, nous avons poursuivi l'objectif global de mieux connaître la relation bidirectionnelle entre le système cholinergique et l'activité épileptique.

Dans un premier temps, nous avons ainsi cherché à établir que l'acétylcholine exerçait une modulation de l'activité épileptiforme dans le néocortex de rat immature, via les récepteurs muscariniques.

Dans un second temps, nous avons cherché à connaître les caractéristiques de cette modulation muscarinique de l'activité épileptiforme néocorticale, notamment en tentant d'identifier le(s) sous-type(s) de récepteur(s) muscarinique(s) impliqué(s).

Dans un troisième temps, nous avons cherché à approfondir les conséquences connues de crises épileptiques précoces sur le fonctionnement et la densité de récepteurs muscariniques cérébraux adultes.

## Chapitre II

***ENDOGENOUS ACETYLCHOLINE  
FACILITATES EPILEPTOGENESIS IN  
IMMATURE RAT NEOCORTEX***

Potier, S., Psarropoulou, C. (2001) *Neuroscience Letters*, 302 : 25-28

En tant que premier auteur de cet article, j'ai effectué toutes les expériences nécessaires à sa rédaction.

Revised ms NSL-DAT-00-021

**ENDOGENOUS ACETYLCHOLINE FACILITATES EPILEPTOGENESIS  
IN IMMATURE RAT NEOCORTEX**

**Soizic Potier and Caterina Psarropoulou<sup>CA</sup>**

Ste-Justine Hospital Research Center and Dept of Pediatrics, Faculty of Medicine,  
Université de Montréal, Montreal , QC, Canada H3T 1C5.

<sup>CA</sup>Corresponding author:

Dr. C. Psarropoulou  
Ste-Justine Hospital Research Center  
3175 Côte-Ste-Catherine  
Montreal, QC, Canada H3T 1C5

tel. (514) 345 4931 ext 6530

fax (514) 345 4801

Running Head: Epileptogenesis in immature cortex

Keywords: cholinergic, eserine, evoked potentials, neuronal synchronization,  
spontaneous

## ABSTRACT

In the presence of the GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline methiodide (BMI, 50 $\mu$ M), synchronous spontaneous and evoked potentials were recorded extracellularly from the deep layers of immature neocortex (postnatal days 10-31, P10-P31) *in vitro*. Addition of the anticholinesterase eserine (10 $\mu$ M) depressed the amplitude (by  $29.5 \pm 6.6\%$ , n=13) and duration (by  $26.3 \pm 4.7\%$ , n=11) of the evoked field potentials in 13/19 slices (68%), and increased significantly the rates of occurrence of spontaneous epileptiform discharges or induced them in 9/19 slices (47%). All these effects were blocked by the muscarinic antagonist atropine (2.5 $\mu$ M, n=3), suggesting that they were mediated by the activation of muscarinic receptors by endogenous acetylcholine.

The cholinergic inhibitory effect is unlikely to terminate seizures, while the excitatory effect, could conceivably promote or aggravate their manifestation. In conclusion, these findings demonstrate that endogenous acetylcholine may contribute to epileptogenesis in immature neocortex.

Previous findings from our laboratory suggested that endogenous acetylcholine[4] (ACh) may enhance epileptogenesis in immature hippocampus via activation of muscarinic receptors[12, 13]. The neocortex is an area crucial not only for the spread of epileptiform activity and the manifestation of seizures, but also for their generation[20]. Cortical cholinergic innervation is dense and moreover develops early in postnatal life[9] (before P10). We therefore investigated the effects of endogenous ACh on the excitatory potentials of immature cortex *in vitro*.

Experiments were carried on 34 slices from 25 Sprague-Dawley rat pups (Charles Rivers, Canada) aged P10-P31. Parasagittal 450-500 $\mu$ m cortical slices were placed in an interface chamber, where they were perfused with warm ( $32\pm 1^\circ$  C) oxygenated (95% O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub>) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) of the following composition (in mM): NaCl 124, KCl 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, CaCl<sub>2</sub> 2, MgSO<sub>4</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 26, glucose 10; pH was 7.4. The white matter was stimulated and extracellular recording electrodes (filled with 4M NaCl; resistance 10-20 M $\Omega$ ) were positioned at the deep cortical layers, the postulated site of origin of interictal discharges[2, 6], in the middle section of each slice corresponding to the somatosensory cortex[19]). Stimulation intensity was adjusted to provoke submaximal field potentials in control ACSF. Evoked potentials were averaged on a digital-oscilloscope and printed on-line, while spontaneous potentials were recorded on a chart recorder; their rates of occurrence (Hz) were calculated from 10-20min periods. Results are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Mean values of parameters measured similar between 7 P10-P20 and 16 P21-P31 slices, therefore all data were pooled together (P10-P31). Bicuculline

methiodide (BMI) and atropine were obtained from Sigma and eserine from Fluka (Switzerland).

The  $\gamma$ -amino butyric acid-A (GABA<sub>A</sub>) channel blocker bicuculline methiodide (BMI, 50 $\mu$ M) perfused 30-60min prior to data recording[8, 16] enhanced the amplitude (17/19 slices) and duration (18/19 slices) of the evoked synaptic responses (**Fig. 1**). The disinhibited responses were often biphasic, with negative deflections superimposed on the positive field, as in the slice shown in Fig.1. The relative amplitude of the negative and positive components varied depending on the recording location. Evoked responses in BMI were substantially larger and longer lasting than controls. Their mean duration, measured from the stimulation artefact to the return of the trace to baseline, was  $720 \pm 121$ ms (n=19) and their peak-to-peak amplitude was  $1.92 \pm 0.20$ mV (n=19). The amplitude of disinhibited responses was  $2.7 \pm 0.3$  times higher (n=17) and their duration was  $5.7 \pm 1.2$  times longer (n=14) than the responses elicited in control ACSF. The greater increase in duration than amplitude suggests indirectly that the principal excitatory effect of BMI was the unmasking of polysynaptic excitatory connections. BMI induced also spontaneous synchronous potentials in 23/23 slices. They consisted of ~1s interictal-like discharges (15/23 slices, 65%, **Fig 2B**) and 6-16s ictal-like discharges (14/23 slices, 61%), occurring with rates ranging between 0.0014-0.0083Hz (1 discharge every 2-12min). Both types consisted of long-lasting field potentials, with polarity depending on the recording location, with superimposed repetitive population spikes. In addition, long-lasting (28-60s) 0.7-1.6mV amplitude negative DC-shifts, starting with intense synchronous discharges, occurring every 2.1-3.3min (0.005-0.008Hz) were induced by BMI in 6/23 slices (26%). Whenever evoked responses were

recorded at the time of appearance of these spontaneous potentials, the former were blocked. These DC-shifts therefore had similar characteristics to spreading depression episodes[10] excepting their small amplitude, indicating that they may represent spreading depression episodes generated in sites remote from the recording sites.

Eserine is an anticholinesterase that increases the concentration of endogenous ACh by inhibiting its catabolism; its reported effects are blocked or reversed by cholinergic antagonists (also in our studies[4, 13]), suggesting that they are mediated by the increase in ACh concentration and they are not due to any direct effects on the neuronal membrane. Eserine 10 $\mu$ M applied in control ACSF had no effect on evoked responses (n=2) similarly to our previous results in hippocampus[13]. However, when eserine (10 $\mu$ M) was applied in the presence of BMI, it inhibited evoked responses in 13/19 slices (68%), by decreasing reversibly their amplitude by  $29.5 \pm 6.6\%$  (n=13) and duration by  $26.3 \pm 4.7\%$  (n=11) (**Fig. 1**). In the remaining 6 slices, eserine either had no effect (n=3) or enhanced (n=3) evoked responses. Similar variable effects of eserine have been previously observed by us in immature hippocampus[4]. The use of 50 $\mu$ M eserine in n=6 slices, produced similar results with the 10 $\mu$ M suggesting that the observed effects were maximal, in line to our previous findings in immature hippocampus[13].

In 9/19 slices (47%), eserine increased also the rates of occurrence of spontaneous discharges and/or induced the appearance of interictal or ictal discharges not observed with BMI alone in the same slice. More specifically, eserine increased the frequency of interictal-like discharges 1.7-5.8 times (n=5 slices, **Fig. 2B**) and that of ictal-like discharges 1.9-3.8 times (n=4 slices), while it induced the latter in n=2 slices



**(Fig. 3).** In Fig. 3, the interictal-like discharges in BMI were replaced by ictal-like in eserine, however this was not a consistent effect. Spontaneous discharges in eserine occurred every 0.4-6.4min (0.0026-0.044Hz), a significant increase when pairs of values were compared (in BMI vs in BMI+eserine, two tailed paired t-test,  $p < 0.05$ ). Moreover, in  $n=2$  slices eserine induced 200-400s-long clusters of spontaneous discharges (not shown), a reversible effect as well. Eserine did not change the rates of recurrence of spontaneous epileptiform discharges in 10/19 slices and had no effect on the slow potential resembling spreading depression (see above) in all 6 slices where it was recorded.

The depressant effects of eserine on the evoked potentials as well as its facilitatory effects on spontaneous discharges were fully reversed by the muscarinic antagonist atropine (2.5 $\mu$ M,  $n=3$ , **Fig. 2**) suggesting that they were mediated by the activation of muscarinic receptors by endogenous ACh. These results are in line to our previous findings in immature hippocampus[4, 13], and are the first demonstration, to the best of our knowledge, of the modulation of epileptiform discharges by endogenous ACh in immature rat neocortex.

Although the depressant cholinergic effects on synaptic transmission have been well characterized (refs in[13]), less is known about the ability of endogenously released ACh to limit effectively epileptiform potentials. The recurrence of epileptiform discharges combined to the long duration of the depolarizations underlying them[1] provoke a large influx of  $Ca^{2+}$ , which may contribute to long-term changes in neuronal function including neurotoxicity[3]. We speculate that the endogenous ACh muscarinic effects of limiting the duration of individual discharges may decrease the probability of

such long-term effects. Against this possibility argues the fact that the evoked responses inhibited here by eserine, resemble interictal discharges and there is no direct evidence linking such discharges to neurotoxicity. In favor of this possibility argues the fact that interictal discharges in immature brain are significantly longer-lasting than in adult[11, 17].

Eserine increased the rates of occurrence of spontaneous epileptiform discharges, in line to our findings in immature hippocampus[4, 13]. However, this excitatory effect of eserine was observed in fewer cortical (47%, this work) compared to hippocampal (58%[13], 94%[4]) slices and in addition, the frequencies recorded in the present experiments are lower than those recorded in immature hippocampus (compare with Table I of ref[4]), for the same postnatal ages and eserine concentration. This apparent difference in the degree of eserine-induced excitation may reflect regional differences in the concentration of released ACh and/or in the density of muscarinic receptors, an explanation which is however not supported by the findings of comparative ontogenetic studies[14, 15]. However, the possibility that regional differences in receptor localization (dendritic vs somatic) renders cholinergic excitation more effective in hippocampus, can not be excluded.

An alternative explanation for this discrepancy would be that hippocampus is wired to support/generate higher frequencies of epileptiform discharges. This idea is supported by the finding that GABA<sub>A</sub> receptor block provokes higher frequency discharges in immature hippocampus than neocortex (from our lab refs[4, 12, 13] vs these experiments, from the work of others[5, 18]). Contrary to this, 4-aminopyridine provokes spontaneous interictal-like discharges with comparable frequencies in

immature cortex[7] and hippocampus[11], thus suggesting that the rates of recurrence of synchronous spontaneous discharges in the two areas may depend more on the mechanism activated than inherent "wiring".

Which of the two effects of endogenous ACh in cortex is likely to play the major role during a seizure? The cholinergic inhibition (amplitude/duration) of epileptiform discharges is unlikely to contribute to seizure termination, unless it could be pharmacologically separated from the concurrent increase in their frequency (for discussion, see[12]). The latter effect however, may clearly facilitate the generation and/or spread of epileptiform discharges, thus promoting or aggravating the manifestation of seizures. In conclusion, these findings demonstrate that endogenous ACh may aggravate epileptogenesis in immature neocortex.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This project has been supported by the NSERC.

**FIGURE LEGENDS**

**FIGURE 1:** Inhibitory effect of eserine on the evoked potentials recorded from a P13 rat cortical slice. Upper trace: In control ACSF, stimulation of the white matter evoked a small synaptic response. Middle trace: Perfusion of 50 $\mu$ M BMI (~1hr) produced a biphasic response, with negative deflections superimposed on the positive field; this disinhibited response was substantially larger and longer lasting than the control. Lower trace: Addition of 10 $\mu$ M eserine reduced the amplitude and duration of the evoked response by 46% and 6% respectively .

**FIGURE 2:** Reversal of the effects of eserine by the muscarinic antagonist atropine. **A.** The disinhibited evoked response recorded in BMI 50 $\mu$ M (upper trace) was decreased by the addition of 10 $\mu$ M eserine (middle trace) in this P14 slice. Further addition (in BMI, eserine) of 2.5 $\mu$ M atropine reversed fully the depressant effect of eserine. **B.** In BMI 50 $\mu$ M, infrequent spontaneous field potentials, resembling interictal discharges, were recorded from this P14 slice (upper trace). Addition of 10 $\mu$ M eserine increased substantially their frequency (middle trace), an effect that was reversed by the subsequent addition of 2.5 $\mu$ M atropine (lower trace).

**FIGURE 3:** Induction of ictal-like discharges by eserine in a P26 slice. BMI 50 $\mu$ M induced the appearance of spontaneous synchronous interictal-like discharges (upper trace). Addition of eserine 10 $\mu$ M induced the appearance of long-lasting 13-17s ictal-like discharges (middle trace), an effect that was partially reversible in the 20min of

recording following eserine wash out (lower trace). The disappearance of interictal-like discharges was not a consistent effect of eserine (see text).

**REFERENCES**

- 1 Ayala, G., Dichter, M., Gumnit, R., Matsumoto, H. and Spencer, W., Genesis of epileptic interictal spikes. New knowledge of cortical feedback systems suggests a neurophysiological explanation of brief paroxysms, *Brain Res.*, 52 (1973) 1-17.
- 2 Connors, B., Initiation of synchronized bursting in neocortex, *Nature*, 310 (1984) 685-687.
- 3 Ghosh, A. and Greenberg, M., Calcium signalling in neurons: Molecular mechanisms and cellular consequences, *Science*, 268 (1995) 239-247.
- 4 Gruslin, E., Descombes, S. and Psarropoulou, C., Epileptiform activity generated by endogenous acetylcholine during blockade of GABAergic inhibition in immature and adult rat hippocampus, *Brain Res.*, 835 (1999) 290-297.
- 5 Hablitz, J.J., Spontaneous ictal-like discharges and sustained potential shifts in the developing rat neocortex, *J. Neurophysiol.*, 58 (1987) 1052-1065.
- 6 Hoffman, S. and Prince, D., Chronic neocortical epileptogenesis in vitro, *J. Neurophysiol.*, 71 (1994) 1762-1773.
- 7 Hoffman, S.N. and Prince, D.A., Epileptogenesis in immature neocortical slices induced by 4-aminopyridine, *Brain Res Dev Brain Res*, 85 (1995) 64-70.
- 8 Hwa, G., Avoli, M., Oliver, A. and Villemure, J., Bicuculline-induced epileptogenesis in the human neocortex maintained in vitro, *Exp. Brain Res.*, 83 (1991) 329-339.

- 9 Mechawar, N. and Descarries, L., Early postnatal development of the cholinergic innervation in the rat cerebral cortex, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 24 (1998) 529.17.
- 10 Psarropoulou, C. and Avoli, M., 4-aminopyridine-induced spreading depression episodes in immature hippocampus: developmental and pharmacological characteristics, *Neuroscience*, 55 (1993) 57-68.
- 11 Psarropoulou, C. and Avoli, M., Developmental features of 4-aminopyridine induced epileptogenesis, *Dev. Brain Res.*, 94 (1996) 52-59.
- 12 Psarropoulou, C., Beaucher, J. and Harnois, C., Comparison of the effects of M1 and M2 muscarinic receptor activation in the absence GABAergic inhibition in immature rat hippocampal CA3 area, *Dev. Brain Res.*, 107 (1998) 285-290.
- 13 Psarropoulou, C. and Dallaire, F., Activation of muscarinic receptors during blockade of GABA<sub>A</sub>-mediated inhibition induces synchronous epileptiform activity in immature rat hippocampus, *Neurosci.*, 82 (1998) 1067-1077.
- 14 Rotter, A., Field, P. and Raisman, G., Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. III. Postnatal development of binding of (3H)propylbenzilylcholine mustard, *Brain Res. Rev.*, 1 (1979) 185-205.
- 15 Sawa, A. and Stavinoha, W., Heterogeneity of postnatal development of Ach levels in brain regions of the mouse, *Dev. Brain Res.*, 34 (1987) 151-155.
- 16 Sutor, B., Hablitz, J.J., Rucker, F. and ten Bruggencate, G., Spread of epileptiform activity in the immature rat neocortex studied with voltage-sensitive dyes and laser scanning microscopy, *J. Neurophysiol.*, 72 (1994) 1756-68.

- 17 Swann, J.W. and Brady, R.J., Penicillin-induced epileptogenesis in immature rat CA3 hippocampal pyramidal cells, *Dev. Brain Res.*, 12 (1984) 243-254.
- 18 Swann, J.W., Smith, K.L. and Brady, R.J., Extracellular K<sup>+</sup> accumulation during penicillin-induced epileptogenesis in the CA3 region of immature rat hippocampus, *Dev. Brain Res.*, 30 (1986) 243-255.
- 19 Swanson, L., *Brain maps: Structure of the rat brain*, 2nd edn., Elsevier, 1998.
- 20 Tsau, Y., Guan, L. and Wu, J., Epileptiform activity can be initiated in various neocortical layers: an optical imaging study, *J. Neurophysiol.*, 82 (1999) 1965-1973.



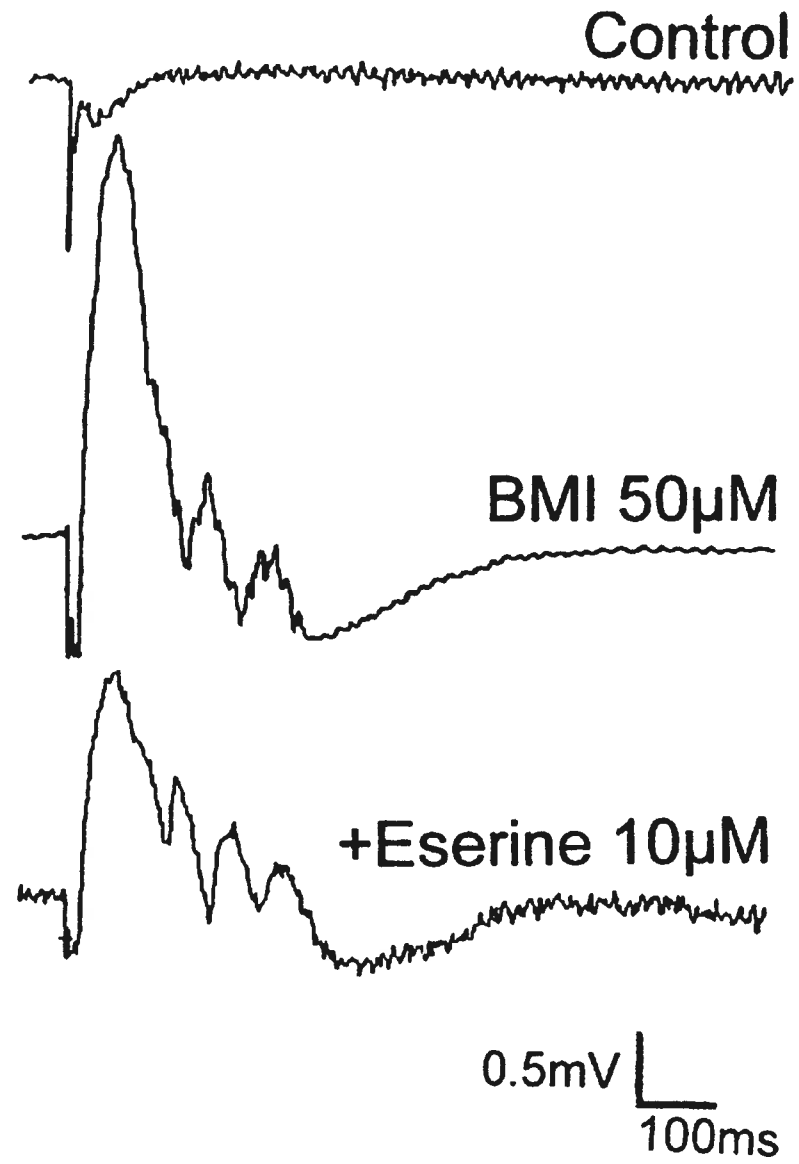


Figure 1

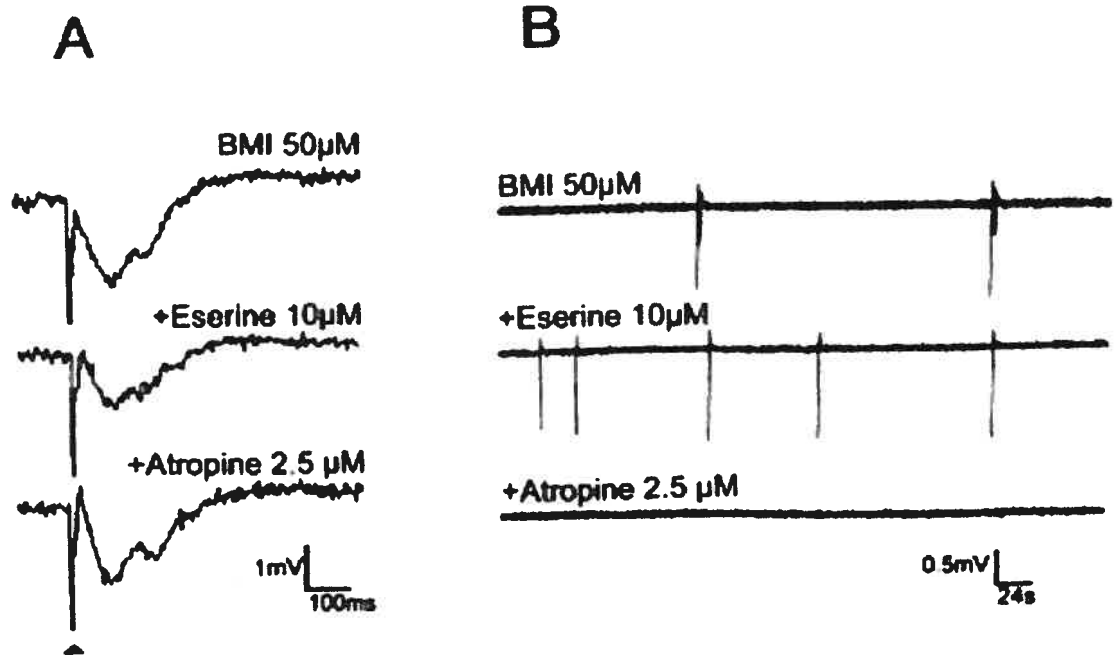


Figure 2

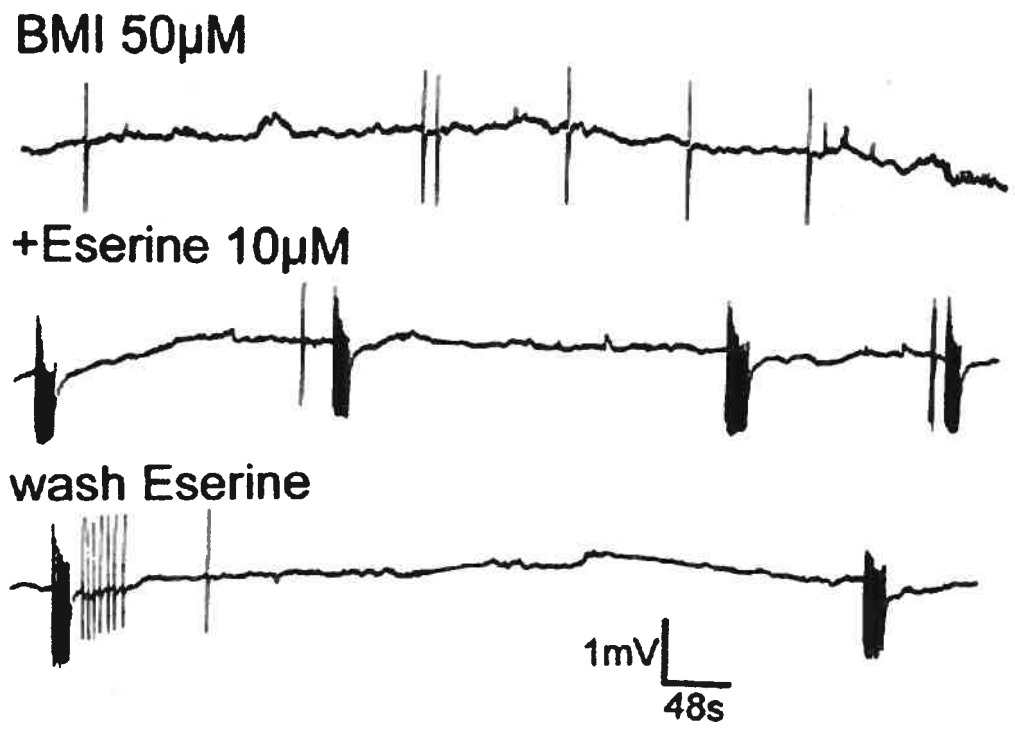


Figure 3

À titre de coauteur de l'article "Endogenous acetylcholine facilitates epileptogenesis in immature rat neocortex." (Soizic Potier and Caterina Psarropoulou (2001), Neuroscience Letters 302(1): 25-28), je suis d'accord pour que Soizic Potier inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Modulation cholinergique de l'activité épileptiforme dans le cortex de rat, et conséquences à long terme de crises précoces expérimentales dans le cortex et l'hippocampe de rat"

C. PSARROPOULOU

Coauteur



Signature

24 Nov 2004

Date

## Chapitre III

***MODULATION OF MUSCARINIC  
FACILITATION OF EPILEPTIFORM  
DISCHARGES IN IMMATURE RAT  
NEOCORTEX***

Potier, S., Psarropoulou, C. (2004) *Brain Research*, 997 : 194-206

En tant que premier auteur de cet article, j'ai effectué et analysé toutes les expériences qui y sont présentées ; j'ai également participé à toutes les étapes de sa rédaction et de ses corrections

**MODULATION OF MUSCARINIC FACILITATION OF EPILEPTIFORM  
DISCHARGES IN IMMATURE RAT NEOCORTEX**

**Soizic Potier and Caterina Psarropoulou<sup>CA</sup>**

Ste-Justine Hospital Research Center and Dept of Pediatrics, Faculty of Medicine,  
University of Montréal, Montreal, QC, Canada H3T 1C5.

<sup>CA</sup>Corresponding author: Dr. C. Psarropoulou

Ste-Justine Hospital Research Center

3175 Côte-Ste-Catherine

Montreal, QC, Canada H3T 1C5

Tel. (514) 345-4931 ext:6530

Fax (514) 345-4801



**ACKNOWLEDGEMENTS**

Funded by National Science and Engineering Research Council (NSERC) and Savoy Foundation for Epilepsy (CP). SP is the recipient of a doctorate studentships from Ste-Justine Research Centre and Savoy Foundation.

## ABSTRACT

We examined the cholinergic effects on epileptiform discharge generation in immature (postnatal day 10-20) rat neocortex. Evoked and spontaneous field potentials were recorded from the deep layers of neocortical slices during GABA<sub>A</sub> receptor blockade by bicuculline methiodide (BMI, 50 $\mu$ M). The anticholinesterase eserine (10 $\mu$ M) as well as the ACh-analog carbamylcholine chloride (CCh, 25 $\mu$ M) decreased the amplitude and duration of evoked field potentials and in parallel, increased significantly the rate of occurrence of spontaneous discharges. These effects were reversed by the muscarinic antagonist atropine (2.5  $\mu$ M, n=20), but not by the nicotinic receptor antagonist hexamethonium (50  $\mu$ M, n=3). The M1 subtype-selective muscarinic antagonist pirenzepine (1  $\mu$ M, n=12) blocked spontaneous discharges in 8/12 slices, while muscarinic antagonists of the M2 (AFDX 116 n=4), M3 (4-DAMP n=4) and M4 (gallamine n=5, tropicamide n=6) type, all at 1  $\mu$ M, only reduced their frequency.

CCh-induced spontaneous discharges were blocked by the combination of the glutamate receptor antagonists AP5 and CNQX (both at 10 $\mu$ M; n=11). Gap junction blockers abolished them (halothane, n=7) or reduced their frequency by 65% (carbenoxolone, n=8). Inhibiting Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores by dantrolene (100 $\mu$ M, n=5) or thapsigargin (1  $\mu$ M, n=5) also depressed their frequencies by 55-65%. By contrast, their rates were not altered by perfusion with high Ca<sup>1+</sup> (7mM; n=6) medium, a manipulation suppressing polysynaptic connections.

These findings demonstrate that activation of muscarinic receptors, notably of the M1 type, in immature rat neocortex facilitates the generation of glutamatergic epileptiform discharges. These discharges are strongly inhibited by gap junction blockers, and are also partly mediated by the, presumably muscarinic receptor-dependent, mobilization of intracellular calcium.

Theme: J

Topic: Human studies and animal models

Keywords: cholinergic, evoked potentials, neuronal synchronization,  
spontaneous, gap junctions



## INTRODUCTION

The cortex, an area involved in the generation [18,63] and spread [20, 65] of epileptiform discharges, has a dense cholinergic innervation [29], which moreover develops early in postnatal life [28]. Immature brain shows an enhanced responsiveness to excitatory-epileptogenic stimuli [26,31,41,60]. These findings, taken together, suggest that cholinergic processes are most likely implicated in epileptiform discharge generation.

We have previously reported that activation of muscarinic receptors by endogenous ACh or cholinergic agonists facilitates epileptiform discharge generation in immature rat hippocampus during disinhibition [14,42], an effect that we subsequently confirmed in neocortical slices of comparable ages [40].

In this study, we investigated the mechanism of this cholinergic effect in immature cortex. We first compared the effects of endogenous ACh to those of the exogenous agonist and their muscarinic vs. nicotinic antagonism, and furthermore the effects of subtype-selective muscarinic antagonists on their frequency. We then tested the sensitivity of the cholinergic discharges to NMDA and non-NMDA glutamate receptor antagonists, gap junction and polysynaptic connection blockers, as well as to the decrease in the mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$

## MATERIALS AND METHODS

Experiments were carried out on 55 neocortical slices from 35 Sprague-Dawley rat pups (Charles River, Canada) of either sex aged 10-20 days postnatally (P10-P20). Animals were decapitated under halothane anesthesia, and their brains were rapidly

removed and submerged in 1-4°C cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF). A block of neocortex including the sensorimotor region was dissected and cut in the parasagittal plane into 450µm-thick slices with a McIlwain tissue chopper. Slices were transferred on the surface of 2 independently perfused channels of a fluid-gas interface chamber, where they were perfused with warm (31°C), oxygenated (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) ACSF. Removable covers placed on top of the channels permitted the maintenance of a humid interface. Perfusion rate was ~1.0 ml/min and ACSF composition was (in mM) : NaCl 124, KCl 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, CaCl<sub>2</sub> 2, MgSO<sub>4</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 26, glucose 10; in the "high Ca<sup>2+</sup> ACSF" experiments, CaCl<sub>2</sub> was 7mM. ACSF had a constant pH (7.4) monitored by the presence of the non-toxic pH-sensitive dye phenol-red (0.03 µM).

Bipolar stimulating electrodes, made from teflon-covered steel wire, were placed on the white matter and stimulation intensity was adjusted to provoke a submaximal field potential in control ACSF. Extracellular recording electrodes filled with 4M NaCl (resistance 10-20 MΩ) were used to record field potentials from the deep layers (IV, V) of the middle rostral-to-caudal section of the slices, corresponding to the sensorimotor cortex. Evoked responses were displayed in a storage oscilloscope, averaged and printed on line. Their amplitude was measured from their positive to their negative peak ("peak-to-peak") and their duration from the stimulation artefact to the return of the trace to the pre-stimulation baseline. Evoked potentials were recorded after a steady state response had been obtained, right before the application of a tested substance (control) and following its perfusion (drug). Spontaneous discharges were displayed in a continuous chart recording and

their rates of occurrence were calculated from 10-20 min continuous recordings, during which stimulation had been switched off.

### **Statistical analysis**

Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M.) throughout the text. Mean values were compared by the two-tailed student's t-test.

### **Substances**

The GABA<sub>A</sub> receptor blocker bicuculline methiodide (BMI), the non-hydrolysable ACh-analog carbamylcholine chloride (carbachol, CCh), the muscarinic antagonist atropine, the nicotinic antagonist hexamethonium chloride (HXM), the M1 muscarinic receptor antagonist pirenzepine and the gap junction blocker carbenoxolone were purchased from Sigma. The NMDA-receptor antagonist D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic (AP5) and the non-NMDA antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3 (CNQX), the M2 muscarinic antagonist AFDX 116, the ryanodine receptor blocker dantrolene and the inhibitor of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase thapsigargin from Tocris. The M4 antagonists gallamine and tropicamide and the M2 agonist oxotremorine-M were purchased from RBI; the M3 antagonist 4-DAMP from Precision Biochemicals, halothane from Bimeda and eserine from Fluka. Stock solutions of all agents were prepared, stored in frozen aliquots and diluted in ACSF to their final concentration prior to the experiments.

## RESULTS

### **Excitatory effects of bicuculline**

In bicuculline (BMI, 50 $\mu$ M, bath applied 30-60 min before the onset of recording) biphasic field potentials with a positive and a negative phase were evoked from all neocortical layers (**Fig. 1A**). The relative amplitude of the two phases depended on the distance from the pial surface and the peak-to-peak amplitude was maximal in the deep layers (IV and V), where all subsequent recordings were made (**Fig. 1B**). Evoked field potential duration was  $452.6 \pm 45.7$  ms and peak-to-peak amplitude  $2.99 \pm 0.23$  mV (n=55 slices), an increase of  $845 \pm 113\%$  and  $124 \pm 14\%$  (n=55) respectively, compared to the values recorded in control ACSF (Fig.1B<sub>1</sub>). The NMDA-type glutamate receptor antagonist AP5 (10 $\mu$ M, n=3) depressed the duration and amplitude of evoked potentials by  $17.2 \pm 9.3\%$  and  $18.2 \pm 8.8\%$  respectively. The non-NMDA-type glutamate receptor antagonist CNQX (10 $\mu$ M, n=3) depressed their duration by  $34.0 \pm 3.0\%$  and amplitude by  $33.3 \pm 18.9\%$ . Neither antagonist blocked them when perfused alone, but their combination abolished them in 5/6 slices (**Fig. 2A & B**). (see also Ref. [43])

BMI induced the appearance of spontaneous discharges in 58/63 slices. These consisted of interictal-like discharges lasting  $<1$ s and observed in 41/58 slices (71%) with rates of occurrence of  $[28.6 \pm 8.8] \times 10^{-3}$  Hz, n=41 (**Fig. 1B<sub>2</sub> and 5A**) and of ictal-like discharges lasting up to 14 s ( $9.8 \pm 0.75$  s, n=31), observed in 31/58 slices (53%) with rates of  $[9.1 \pm 3.1] \times 10^{-3}$  Hz, n= 31 (**Fig. 4C and 5A, B**). Ictal-like discharges consisted of an initial large discharge followed by a series of secondary

discharges (intradischarge frequency 1-3Hz) in 26/31 slices (**Fig. 5A**) or a high frequency oscillatory discharge in 5/31 slices (intradischarge frequency 4-6 Hz, **Fig. 5B**); either type was recorded in slices spanning the P10-P20 developmental window. Evoked and spontaneous discharges in BMI were "controls" for all the experiments that follow.

### **Cholinergic modulation of evoked field potentials**

Eserine (10 $\mu$ M, n=12 slices) depressed reversibly the amplitude and duration of evoked field potentials by  $33.2\% \pm 5.5$  (n=12; paired t-test  $p < 0.0001$ ) and  $40.3\% \pm 9.5$  (n=10; paired t-test  $p < 0.0001$ ) respectively (**Fig. 3A**). By contrast, it had no effect on cortical field potentials recorded in standard ACSF (n=3, not shown) similarly to earlier findings in hippocampus[14]. The ACh-analog CCh (25 $\mu$ M, n=29 slices) depressed the amplitude and duration of evoked potentials by  $43.4\% \pm 4.2$  (n=29) and  $45.0\% \pm 5.5$  (n=26) respectively (**Fig. 3B**) notwithstanding the appearance of a CCh-induced oscillatory component in a few of the slices (**e.g. Fig. 2C, D and 3C**). The muscarinic antagonist atropine (2.5  $\mu$ M) fully reversed the effects of eserine (n=13) or CCh (n=7) (**Fig. 3A and B**). By contrast, the nicotinic antagonist hexamethonium (50  $\mu$ M, n=3) was ineffective (**Fig. 3C**).

After the depressant effect of CCh had reached a steady state, bath application of 10  $\mu$ M AP5 caused an additional depression of fEPSP amplitude by  $36.4 \pm 10.1\%$  and duration by  $48.8 \pm 11.6\%$  (n=5). In CCh, 10  $\mu$ M CNQX depressed fEPSP amplitude by  $25 \pm 4.0\%$  and duration by  $42 \pm 31.0\%$  (n=2). The combination of AP5 and CNQX abolished evoked potentials in 5/7 slices, while in the two remaining

slices a small deflection from baseline was still observed in their presence.

### **Cholinergic modulation of spontaneous epileptiform field potentials**

#### *Agonists*

Eserine (10  $\mu$ M, n=10) induced reversibly spontaneous discharges or increased their rates of occurrence, often by more than 100% (**Fig. 4A and 5**); these effects were mimicked by 50  $\mu$ M eserine (n=7), suggesting they were maximal. In standard ACSF, eserine (10  $\mu$ M) did not provoke any spontaneous field discharges (n=3 slices). CCh (25 $\mu$ M, n=45) induced higher frequency spontaneous discharges than eserine (**Fig. 5**), and its effects were mimicked by the muscarinic agonist oxotremorine-M (2.5  $\mu$ M, n=2, not shown). In slices where both interictal- and ictal-like discharges were recorded in BMI, a substantial increase in the frequency of one type was often accompanied by abolition of the other, as illustrated in **Fig. 4B and C**; however neither eserine nor CCh appeared to favor consistently one type of discharge.

#### *Muscarinic vs. nicotinic antagonism*

The muscarinic antagonist atropine (2.5 $\mu$ M) abolished the spontaneous discharges induced by eserine in 3/6 slices, while in the remaining 3 their frequency was reduced by  $49 \pm 18$  %. Atropine abolished the CCh- or oxotremorine-M-induced discharges in 4/5 and 2/2 slices respectively. By contrast, the nicotinic antagonist hexamethonium (50 $\mu$ M) had no consistent effect on the frequency of CCh-induced discharges in 3 slices (**Fig. 4C**).

### *Subtype-selective muscarinic antagonists*

The following subtype-selective muscarinic antagonists were tested at a concentration of 1  $\mu$ M. All reduced reversibly the frequency of CCh-induced spontaneous discharges without any apparent distinction between ictal- or interictal-like discharges. Pirenzepine (M1 antagonist, n=12) abolished the CCh-induced discharges in 8/12 slices and depressed their frequencies by  $66\% \pm 8.8$  in the remaining 4; AFDX 116 (M2 antagonist, n=4) depressed them by  $42.0 \pm 8.6 \%$ ; 4-DAMP (M3 antagonist, n=4), depressed them by  $82.0 \pm 8.2 \%$  and in addition, abolished the discharges recorded in CCh and pirenzepine (n=3); Tropicamide (M4 antagonist) depressed the frequency of spontaneous potentials by  $59.0 \pm 9.4 \%$  (n=6), while an other M4 antagonist, gallamine lowered their frequency by  $50.0 \pm 7.2 \%$  (n=5).

## **Modulation of spontaneous cholinergic field potentials**

### *Glutamate receptor antagonists*

AP5 (10  $\mu$ M) reduced the frequency of spontaneous CCh-induced discharges by  $76.2 \pm 11.7 \%$  (n=6; **Fig. 6**) and CNQX (10  $\mu$ M) by  $95.1 \pm 3.4 \%$  (n=5); the combination of AP5 and CNQX abolished spontaneous CCh-induced discharges in 10/11 slices.

### *Polysynaptic and non-synaptic interactions*

Perfusion with high  $\text{Ca}^{2+}$  ACSF (7mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), a manipulation which blocks polysynaptic activity by a stabilizing effect on neuronal membrane [2], had no

effect on the frequency of CCh-induced spontaneous discharges in 6 slices (**Fig. 7A**). By contrast, the gap junction blocker halothane (2.5%) [57] abolished the CCh-induced discharges in 7/7 slices (**Fig. 7B<sub>1</sub>**) while carbenoxolone (100 $\mu$ M n=5; 500 $\mu$ M n=3), another gap junction blocker, decreased their frequency by  $63.68 \pm 11.87$  % (n=8; **Fig. 7B<sub>2</sub>**) carbenoxolone-resistant spontaneous discharges were abolished by the addition of halothane in 5/5 slices.

#### *Intracellular calcium stores*

Muscarinic receptor-induced inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) increase provokes calcium release from intracellular stores [37,51], which in turn activates the ryanodine receptor via calcium-induced calcium-release mechanisms [15,51] leading to further increase of  $[Ca^{2+}]_i$ . The ryanodine receptor blocker dantrolene (100  $\mu$ M, n=5) had a strong depressant effect in the frequency of CCh-induced spontaneous discharges in three slices (depression by  $95.0 \pm 2.4$  %) and a moderate in two ( $15.4 \pm 4.9\%$ ); in each slice, ictal and interictal discharges were depressed to a similar extent. Thapsigargin (1  $\mu$ M, n=5), an irreversible blocker of the sarco/endoplasmic reticulum calcium adenosine triphosphatase which maintains intracellular calcium stores [15, 51] had no effect in two slices and depressed the frequency of CCh-induced spontaneous discharges by  $56.0 \pm 22.0$  in the remaining three.



## DISCUSSION

Cholinergic agonists applied during disinhibition in immature neocortical slices have a depressant effect on evoked potentials, but a strong facilitatory effect on spontaneous field potentials that constitute the observed epileptiform activity; the facilitatory effect appears to outweigh the depressant effect. The generation of recurring spontaneous discharges is mediated by a muscarinic, M1 type in particular, receptor-mediated facilitation of glutamatergic excitation, however, activation of polysynaptic excitatory connections does not appear to play any significant role. An apparent necessary condition for the manifestation of the muscarinic effects is the function of gap junctions. In addition, mobilization of  $[Ca^{2+}]_i$ , presumably by muscarinic receptor activation, plays a facilitatory role in the occurrence of these discharges.

### **Excitatory effects of bicuculline**

The GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline (BMI) enhanced the evoked and induced the appearance of spontaneous field potentials [14, 40, 42, 44]. BMI increased evoked potential duration several times more than the amplitude [40] suggesting a major effect of GABA<sub>A</sub> receptor block in unmasking polysynaptic excitatory connections. Evoked excitatory potentials were largest in the deep layers, the reported origin of epileptiform discharges [6,17,118].

The maximal frequencies of spontaneous BMI-induced discharges were higher than in our earlier reports in cortex [40] and hippocampus [42, 44]. With respect to cortex, this difference is explained by the younger sample of the present study (P10-P20 as opposed to P10-P31 in ref. [40]), given that the frequencies of spontaneous epileptiform potentials decrease with maturation [41]. This argument is also indirectly

supported by the rare observation of spontaneous discharges in adult neocortical slices in these conditions (Potier & Psarropoulou, unpublished observations; see also Ref. [20]). With respect to hippocampus, this difference is unlikely to be explained by differences in inhibitory control of the two areas, since first, they show similar timing of the maturation of GABAergic inhibition [61] and second, the major constituent of GABAergic inhibition, the GABA<sub>A</sub>-mediated potentials, was blocked during these experiments. We therefore speculate that it may reflect differences in neuronal connectivity patterns or in the role of non-synaptic factors in synchronous discharge generation in the two areas (see below).

### **Cholinergic effects on disinhibited epileptiform field potentials**

Eserine, an indicator of endogenous ACh activity, and the ACh-analog CCh depressed evoked potentials, an effect reversed by the muscarinic antagonist atropine. Muscarinic inhibition of transmitter release is well documented [3, 8, 12, 46, 54, 66], and it probably implicates presynaptic M2 receptors inhibiting glutamate release [24, 49]. The postsynaptic M2 receptors that shunt excitatory synaptic input by activating a GIRK current [53] may also contribute to this depressant effect.

Eserine or CCh increased also the frequency of spontaneous discharges, an effect reversed by atropine [42,44]. The paradox of simultaneous depression and increase in the frequency of spontaneous discharges has been previously reported and discussed by us [14, 42, 44] and others [55]. The effects of eserine suggest that an increase in endogenous ACh during disinhibition (BMI) activates muscarinic receptors (see also Ref. [14]). Such findings are physiologically relevant since endogenous ACh levels

often vary as a result of behavioral or pathophysiological conditions (see Refs. in [14]) The excitatory effect of CCh was more pronounced than this of eserine (graph of Fig. 4), although their depressant effects -on evoked discharges- were quantitatively similar. Given that the concentrations of both agents were maximally effective (eserine, this work; CCh, see [42,44]), this finding suggests that only the depressant effect can be saturated by the eserine-induced increase of endogenous ACh. This difference in their effectiveness indicates that spontaneous endogenous ACh release is limited compared to the exogenously applied agonist. Other possible explanations are that receptors mediating the excitatory effect may have higher affinity for the exogenous agonist or may be located at extrasynaptic sites [10, 64], thus demanding higher concentrations or prolonged exposure (see also Ref. [42]).

#### *Nicotinic and subtype-selective muscarinic antagonists*

Spontaneous synchronous cholinergic discharges were abolished by atropine but were unaffected by the nicotinic receptor antagonist hexamethonium, confirming their muscarinic nature (see also Refs. [40, 42, 45]).

To determine the relative contribution of muscarinic receptors present in the cortex, we used subtype-selective muscarinic antagonists at the relatively low concentration of 1  $\mu$ M, which does not significantly compromise their selectivity. Of these, pirenzepine shows high affinity for the M1 receptor, intermediate for M3 and low for the M2; 4-DAMP shows high affinity for both M3 and M1 receptors; AFDX 116 shows high affinity for the the M2 receptor and very low affinity for the M3 (References in ref.[8]) and both tropicamide and gallamine are selective for M4

receptors [11]. All antagonists tested depressed the frequency of spontaneous discharges (see also Ref.[42]), however, only pirenzepine abolished spontaneous potentials (in 8/12 slices). The second most effective agent at 1  $\mu$ M was 4-DAMP, which depressed the frequency of spontaneous discharges by ~80%. Given that 4-DAMP was less effective than pirenzepine despite its lower  $EC_{50}$  (0.19 vs. 0.53  $\mu$ M, see Ref. [42]), we suggest a primary role for the M1 receptors, followed by M3. Indeed, the ml\* receptor (\*genetically defined, but coincides with the M1 defined pharmacologically, see Refs. [5, 16]) is found postsynaptically on excitatory synapses [32], has the highest density in rodent cortex [23], and in addition has been reported to mediate the cholinergically-induced seizures [9,16].

### **Modulation of cholinergic epileptiform potentials**

#### *NMDA and non-NMDA glutamate receptors*

The depressant effects of the antagonists AP5 and CNQX indicate that disinhibited potentials are composed by both NMDA- and non-NMDA components [43]. Furthermore, the similar depressant effects of each antagonist in BMI or in BMI+CCh suggest a non-selective depressant effect of the latter (CCh). With respect to spontaneous discharges, the CNQX depressant effect was larger than that of AP5, similarly to findings in immature hippocampus [42].

#### *Polysynaptic connections*

Blockade of polysynaptic connections by perfusion with high  $Ca^{++}$  ACSF (7mM), [2] did not alter the frequency of the CCh-induced spontaneous discharges, indicating

that their contribution -if any- must be minimal. This result contrasts earlier findings in immature hippocampus (CA3 area), where high  $\text{Ca}^{2+}$  ACSF blocked reversibly the CCh-induced discharges in similar conditions [42].

### *Gap junctions*

Halothane [38, 58] blocked and carbenoxolone [22, 48, 52, 67] reduced the frequency (by -60%) of the spontaneous CCh-induced discharges at doses commonly used to block gap junctions (see references above). The lower efficacy of carbenoxolone, is unlikely related to its concentration (identical effects were found with 100 or 500  $\mu\text{M}$ , see also [25]), and is likely relevant to its lower efficacy as an uncoupling agent, compared to halothane [50]. On the other hand, the apparent higher potency of halothane (i.e. the complete block of spontaneous discharges) may be relevant to some of its non-specific actions [50]. It should be mentioned however, that the antiepileptic effect of this and other gap junction blockers was reported to be independent of their synaptic effects [22].

Antiepileptic effects of gap-junction blockers have been previously demonstrated in adult preparations including cortex [13, 22, 39, 69] (review in Ref. [4]) Our findings demonstrate the pivotal role of gap junctions in the generation and spread of epileptiform discharges in immature compared to adult brain [4], due at least partially to the peak in their numbers during development [4, 34]. Dye coupling, an indicator of electrical neuronal coupling, declines in cortex between P15 and P20 [7, 38, 47]; the extent of this decline ranging from rare coupling [38, 47] to coupling among 40% of neurons between P10 and P18 [7]. However, this

decrease does not entail the disappearance of gap junctions in older – adult – preparations, where glial–glial or glial–neuron locations are frequently reported [59, 62] in addition to a smaller scale neuronal coupling [7] (also references in Ref. [59]) Moreover, gap junctional conductance is influenced by chemical transmission [56], and gap junction coupling was shown to increase during hyperexcitable states [39, 52]

The participation of cortical gap junctions in seizure generation, taken together with the enormous plasticity of the immature brain, make plausible the hypothesis that a permanent upregulation in their numbers may underlie the long term effects of immature seizures in brain development. This hypothesis is supported by the finding of increased expression of gap junction-associated connexins in the cortex of patients with intractable epilepsy [1, 35].

#### *Intracellular calcium stores*

The ryanodine receptor blocker dantrolene (100 $\mu$ M [15,51]) and the irreversible blocker of the sarco/endoplasmic reticulum calcium adenosine triphosphatase thapsigargin (1 $\mu$ M [15, 37, 51]) depressed the frequency of epileptiform CCh-induced discharges by about 55-65%. Hadar et al. [15] have reported a dantrolene-induced conversion of ictal to interictal type discharges, which we did not observe in our preparation, despite the similarity in the generating mechanism -cholinergic- of epileptiform discharges in the two studies. This difference may be associated to area (cortex vs. hippocampus) or age (immature vs. adult) differences in the respective preparations.

The importance of intracellular calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) regulation in epileptiform hypersynchrony is well documented. Dantrolene abolished seizures provoked by a metabotropic glutamate receptor agonist [27], prevented their development following trauma [68] and reduced the occurrence of pilocarpine-induced epileptiform discharges [15, 51]. Moreover, Pal and al. [37] have found a disturbed  $[Ca^{2+}]_i$  homeostasis in "epileptic" neurons, that is an increased calcium release from internal stores together with decreased removal and sequestration.

Muscarinic receptor activation, in particular of the M1 and M3 type [36], increases calcium release from its intracellular stores, by increasing IP3 synthesis. The initial  $[Ca^{2+}]_i$  increase activates high threshold plasma membrane channels which then mediate further  $Ca^{2+}$  release ("Ca<sup>2+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup>-release") [21, 33]. The depressant effects of dantrolene and thapsigargin in our experiments suggest that the epileptogenic effects of CCh or endogenous ACh (eserine) may be partially mediated by a muscarinic receptor-induced increase in  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### CONCLUDING REMARKS

These experiments demonstrated that activation of muscarinic receptors during disinhibition promotes the generation of ictal- and interictal-like epileptiform discharges in immature neocortex *in vitro*. The concurrent depressant effect on synaptic transmission is apparently outweighed by the increase in neuronal excitability (by muscarinic block of K<sup>+</sup> channels [5]) leading to an increase in the frequency of glutamatergic spontaneous discharges. The antagonist experiments suggested that the M1 muscarinic receptor plays a major role in these epileptogenic effects.

Cholinergic discharge frequency was reduced by inhibitors of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores, suggesting that muscarinic mobilization of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; from its stores partly mediated these effects. Finally, the experiments with gap junction blockers suggested that their presence greatly augments the frequency of synchronous discharges provoked by muscarinic receptor activation. The developmental changes in gap junction expression [4, 34] make likely the possibility that the epileptogenic muscarinic effects are also age-dependent (see also Refs [14]). If this is confirmed, then cholinergic mechanisms may have a greater role in immature seizure generation compared to adult. And because of the muscarinic increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , a process associated with neuronal plastic changes or damage [19], activation of muscarinic receptors may contribute to the potential of early life seizures to alter adult brain physiology [30]



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** Excitatory evoked field potentials recorded from immature neocortical slices in the presence of bicuculline (BMI, 50 $\mu$ M). **A:** Field potentials recorded from different strata of a P14 sensorimotor cortex slice following white matter (WM) stimulation. Biphasic field potentials were readily evoked from all layers; the relative amplitude of their positive and negative phase varied with distance from the brain surface (top side of the slice section shown on the left). Their peak-to-peak amplitude was maximal in the middle to deep layers, although not at sites closest to the stimulating electrode. Successive recording locations differed by approximately 100  $\mu$ m; each trace is the average of four responses. **B1:** Perfusion with 50  $\mu$ M BMI increased the peak-to-peak amplitude and the duration of evoked potentials by 1325% and 600% respectively in this P13 slice. **B2:** In the same slice, BMI induced the appearance of infrequent spontaneous field potentials, the features of which (when recorded at high speed, not shown here) were similar to those of the evoked potentials, making them interictal-like.

**Figure 2:** Effects of the glutamate receptor antagonists on the evoked excitatory field potentials recorded in 50 $\mu$ M BMI (A, B) or in BMI and 25  $\mu$ M CCh (C, D). **A.** In this P15 slice, perfusion with the NMDA glutamate receptor antagonist AP5 (10  $\mu$ M) depressed the excitatory field potential and addition of the non-NMDA glutamate receptor antagonist CNQX (10  $\mu$ M) abolished it. **B:** In this P17 slice, the antagonists were added in the reverse order: First, CNQX depressed the excitatory

field potential and addition of AP5 abolished it. **C:** In this P15 slice, addition of CCh to BMI depressed evoked excitatory field potentials, shown in the upper traces of C and D as controls. AP5 depressed the field potentials and abolished the repetitive population spikes; addition of CNQX depressed further to a near block. This specific slice is the single example, where the combination of AP5 and CNQX did not abolish the response. **D:** In this P14 slice, in the presence of CCh, CNQX reduced the amplitude of the evoked discharge and abolished the repetitive population spikes, and further addition of AP5 blocked it completely.

**Figure 3:** Reversal of cholinergic depression of evoked excitatory field potentials by a muscarinic (atropine) but not a nicotinic (hexamethonium, Hxm) antagonist. **A:** In this P16 slice the anticholinesterase eserine (10  $\mu$ M) depressed the evoked response, an effect reversed by addition of 2.5  $\mu$ M atropine. **B:** In this P15 slice, the non-hydrolysable ACh-analog carbachol (CCh, 25  $\mu$ M) nearly abolished the evoked response, an effect reversed by addition of atropine. **C:** Hxm (50  $\mu$ M) did not reverse the depressant effect of CCh in this P17 slice.

**Figure 4:** Cholinergic effects on the frequency of the BMI-induced spontaneous field potentials. **A.** BMI induced only rare spontaneous discharges (a single one in the portion of the trace shown here) in this P16 slice. Addition of eserine increased their rate and in addition introduced a longer lasting ictal-like discharge (first two discharges on eserine trace). These effects were completely reversed by addition of the muscarinic antagonist atropine to the ACSF **B.** BMI induced interictal-like

discharges with a frequency of  $14.8 \times 10^{-3}$  Hz in this P16 slice. Addition of CCh increased their frequency to 0.375 Hz, a 25-times increase and further addition of atropine blocked them. C. BMI induced interictal-like discharges with a frequency of 0.104 Hz in this P20 slice. Addition of CCh introduced longer-lasting ictal-like discharges ( $52 \times 10^{-3}$  Hz) but decreased the frequency of interictal. The nicotinic antagonist hexamethonium (Hxm), added in the presence of CCh, had no significant effect of the frequency of the ictal-like discharges. Although a decrease is suggested by this portion of the recording, this was not confirmed when a longer period were examined.

**Figure 5:** Samples of ictal- and interictal-like discharges in  $50\mu\text{M}$  BMI (A, B) and changes in their rates following addition of  $10\mu\text{M}$  eserine or  $25\mu\text{M}$  carbachol (CCh) (C, D) **A:** Spontaneous interictal- (rate of occurrence 0.0935 Hz) and ictal-like discharges (0.0569 Hz) recorded from a P15 slice (a1). Ictal-like discharges consisted of a primary and a series of secondary bursts with intraburst frequency 2.95 Hz (a2) and interictal-like discharges resembled the evoked potentials recorded in these conditions (in BMI) (a3) **B:** In this P13 slice BMI induced ictal-like discharges consisting of a high intradischarge frequency (5.71 Hz) oscillatory response (b1) with no evident distinction between the initial and the remaining bursts (b2). Calibration bars: a1, 0.42mV, 4.5s; a2, 0.625mV, 0.42s; a3, 0.5mV, 0.5s; b1, 0.67mV, 10s; b2, 0.625mV, 1.5s. **C:** Interictal-like discharges: Low frequencies were recorded in BMI (n= 41 slices), while those recorded in BMI & eserine (n= 5 slices) were slightly but not significantly higher ( $p > 0.05$  with unpaired

student's t-test). By contrast, frequencies recorded in BMI & CCh (n=23 slices) were significantly higher compared to those in BMI ( $***p<0.0001$ ) or in BMI & eserine ( $*p=0.0101$ ). Error bars represent the standard error of mean (SEM) in this and D. D: Ictal-like discharges: Low frequencies were recorded in BMI (n=31 slices), while those recorded in BMI & eserine (n=4 slices) were significantly higher ( $*p=0.03$ ). Frequencies recorded in BMI & CCh (n=22 slices) were higher than in both previous conditions, but this difference reached statistical significance only compared to BMI ( $**p=0.0051$ ; BMI & eserine vs. BMI and CCh  $p>0.05$ , probably due to the large SEM).

**Figure 6:** Effects of the NMDA and non-NMDA glutamate receptor antagonists AP5 and CNQX on the frequency of spontaneous discharges recorded in 50  $\mu\text{M}$  BMI and 25  $\mu\text{M}$  CCh. **A.** Rare ictal-like discharges ( $8.33 \times 10^{-3}$  Hz) were recorded in BMI in this P15 slice. Addition of CCh, introduced high frequency interictal-like discharges that were abolished following inclusion of 10  $\mu\text{M}$  CNQX in the ACSF. **B.** BMI induced low frequency ( $9.26 \times 10^{-3}$  Hz) ictal-like discharges in this P16 slice, and addition of CCh increased their rate to  $31.7 \times 10^{-3}$  Hz. AP5 perfusion in BMI and CCh reduced their frequency to  $15.8 \times 10^{-3}$  Hz, and addition of CNQX abolished them.

**Figure 7:** Effects of high  $\text{Ca}^{2+}$  (7mM) ACSF and of gap junction blockers on the frequency of spontaneous field potentials in BMI and CCh. **A:** BMI induced ictal-like discharges with a rate of  $21.0 \times 10^{-3}$  Hz in this P18 slice and CCh introduced high frequency (0.625 Hz) interictal-like discharges in addition to the former. A switch

ACSF containing 7mM Ca<sup>2+</sup> (+BMI, +CCh) had no significant effect on the frequency of either type of discharge. **B1**: In this P17 slice, BMI induced low frequency ( $67 \times 10^{-3}$  Hz) spontaneous discharges and addition of CCh increased their rates to 0.835 Hz. Perfusion of the gap junction blocker halothane (in BMI and CCh) abolished all spontaneous discharges. **B2**: In this P19 slice, BMI induced infrequent ( $1.45 \times 10^{-3}$  Hz) spontaneous discharges and CCh increased their rate to  $48.6 \times 10^{-3}$  Hz. The gap junction blocker carbenoxolone decreased their frequency to  $21.1 \times 10^{-3}$  Hz; further addition of halothane abolished them (not shown).

## REFERENCES

- [1] E. Aronica, J. Gorter, G. Jansen, S. Leentra, B. Yankaya and D. Troost, Expression of connexion 43 and connexion 32 gap-junction proteins in epilepsy-associated brain tumors and in the perilesional epileptic cortex, *Acta Neuropathol.*, 101 (2001) 449-459
- [2] M. Berry, and V. Pentreath, Criteria for distinguishing between monosynaptic and polysynaptic transmission, *Brain Res.*, 105 (1976) 1-20.
- [3] D. Brown, F. Abogadie, T. Allen, N. Buckley, M. Caulfield, P. Delmas, J. Haley, J. Lamas and A. Selyanko, Muscarinic mechanisms in nerve cells, *Life Sci.*, 60 (1997) 1137-1144.
- [4] P. Carlen, F. Skinner, L. Zhang, C. Naus, M. Kushnir and J. Velasquez, The role of gap junctions in seizures, *Brain Res. Rev.*, 32 (2000) 235-241.
- [5] M. Caulfield, Muscarinic receptors-characterization, coupling and function, *Pharmacol. Ther.*, 58 (1993) 319-379.
- [6] B. Connors, Initiation of synchronized bursting in neocortex, *Nature*, 310 (1984) 685-687.
- [7] B. Connors, L. Benardo and D. Prince, Coupling between neurons of the developing rat neocortex, *J. Neurosci.* 3 (1983) 773-782
- [8] C. Cox, C., Metherate, R. and Ashe, J., Modulation of cellular excitability in neocortex: Muscarinic receptor and second messenger-mediated actions of acetylcholine, *Synapse*, 16 (1994) 123-136.

- [9] J. Cruickshank, S. Brudzynski, and R. McLachlan, Involvement of M1 muscarinic receptors in the initiation of cholinergically induced epileptic seizures in the rat brain, *Brain Res.*, 643 (1994) 125-129.
- [10] L. Descarries and N. Mechawar, Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system, *Prog. Brain Res.*, 125 (2000) 27-47.
- [11] C. Felder, F. Bymaster, J. Ward, and N. DeLapp, Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system, *J. Med. Chem.*, 43 (2000) 4333-4353.
- [12] D. Fernandez de Sevilla, C. Cabezas, A. Oshima de Prada, A. Sanchez-Jimenez and W. Buno, Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons., *J. Physiol.*, 545 (2002) 51-63.
- [13] F. Grenier, I. Timofeev, M. Steriade, Neocortical very fast oscillations (ripples, 80-200Hz) during seizures: intracellular correlates, *J. Neurophysiol.*, 545 (2002) 51-63
- [14] E. Gruslin, S. Descombes and C. Psarropoulou, Epileptiform activity generated by endogenous acetylcholine during blockade of GABAergic inhibition in immature and adult rat hippocampus, *Brain Res.*, 835 (1999) 290-297.
- [15] E. Hadar, Y. Yang, U. Sayin and P. Rutecki, Suppression of pilocarpine-induced ictal oscillations in the hippocampal slice, *Epilepsy Res.*, 49 (2002)

61-71.

- [16] S. Hamilton, M. Loose, M. Qi, A. Levey, B. Hille, G. McKnight, R. Idzerda, and N. Nathanson, Disruption of the ml receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94 (1997) 13311-13316.
- [17] S. Hoffman, and D. Prince, Chronic neocortical epileptogenesis in vitro, *J. Neurophysiol.*, 71 (1994) 1762-1773.
- [18] S. Hoffman and D. Prince, Epileptogenesis in immature neocortical slices induced by 4- aminopyridine, *Dev. Brain Res.*, 85 (1994) 64-70.
- [19] G. Holmes, Seizure-induced neuronal injury: animal data, *Neurology*, 59 (2002) S3-6.
- [20] G. Hwa and M. Avoli, The involvement of excitatory amino acids in neocortical epileptogenesis : NMDA and non-NMDA receptors, *Exp. Brain Res.*, 86 (1991) 248-256
- [21] A. Irving and G. Collingridge, A characterization of muscarinic receptor-mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization in cultured rat hippocampal neurones, *J. Physiol.*, 511 ( Pt 3) (1998) 747-59.
- [22] R. Kohling, S. Gladwell, E. Bracci, M. Vreugdenhil and J. Jefferys, Prolonged epileptiform bursting induced by 0-Mg(2+) in rat hippocampal slices depends on gap junctional coupling, *Neuroscience*, 105 (2001) 579-587
- [23] A. Levey, C. Kitt, W. Simonds, D. Price and M. Brann, Identification and



- localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies, *JNeurosci*, 11 (1991) 3218-3226.
- [24] M. Marchi and M. Raiteri, Interaction acetylcholine-glutamate in rat hippocampus: Involvement of two subtypes of M2 muscarinic receptors, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 248 (1988) 1255-1260.
- [25] D. Margineanu and H. Klitgaard, Can gap junction blockade preferentially inhibit neuronal hypersynchrony vs. excitability?, *Neuropharmacol.*, 41 (2001) 377-383.
- [26] T. McCown and G. Breese, The developmental profile of seizure genesis in the inferior collicular cortex of the rat: relevance to human neonatal seizures, *Epilepsia*, 33 (1992) 2-10.
- [27] J. McDonald, A. Fix, J. Tizzano, D. Schoepp, Seizures and brain injury in neonatal rats induced by 1 S,3R-ACPD, a metabotropic glutamate receptor agonist., *J. Neurosci.*, 13 (1993) 4445-4455.
- [28] N. Mechawar and L. Descarries, Early postnatal development of the cholinergic innervation in the rat cerebral cortex, *Soc. Neurosci. Abstr.* 24 (1998) 529.17
- [29] N. Mechawar, C. Cozzari and L. Descarries, Cholinergic innervation in adult rat cerebral cortex: a quantitative immunocytochemical description, *J. Comp. Neurol.*, 428 (2000) 305-318.
- [30] S. Meilleur, N. Aznavour, L. Descarries, L. Carmant, O. Mamer and C.

- Psarropoulou, Pentylentetrazol-induced seizures in immature rats provoke long-term changes in adult hippocampal cholinergic excitability, *Epilepsia*, 44 (2003) 507-517.
- [31] S. Moshe and B. Albala, Maturation changes in postictal refractoriness and seizure susceptibility in developing rats, *Ann. Neurol.*, 13 (1983) 552-557.
- [32] L. Mrzljak, A. Levey and P. Goldman-Rakic, Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 90 (1993) 5194-5198.
- [33] W. Muller and J. Connor, Cholinergic input uncouples  $Ca^{2+}$  changes from  $K^+$  conductance activation and amplifies intradendritic  $Ca^{2+}$  changes in hippocampal neurons, *Neuron*, 6 (1991) 901-905.
- [34] C. Naus and M. Bani-Yaghoub, Gap junctional communication in the developing central nervous system, *Cell Biol. Int.*, 22 (1998) 751-763.
- [35] C. Naus, J. Bechberger, D. Paul, Gap junction gene expression in human seizure disorder, *Exp. Neurol.*, 111 (1991) 198-203
- [36] Z. Nemethy, G. Makara and Z. Acs, Effect of cholinergic drugs on the concentration of intracellular free calcium of rat pituitary intermediate lobe cells, *Brain Res. Bull.*, 50 (1999) 53-57.
- [37] S. Pal, D. Sun, D. Limbrick, A. Rafiq and R. DeLorenzo, Epileptogenesis induces long-term alterations in intracellular calcium release and sequestration

mechanisms in the hippocampal neuronal culture model of epilepsy, *Cell Calcium*, 30 (2001) 285-296.

- [38] A. Peinado, R. Yuste and L. Katz, Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation, *Neuron*, 10 (1993) 103-114
- [39] J. Perez-Velazquez, T. Valiante and P. Carlen, Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electronic coupling in epileptogenesis, *J. Neurosci.*, 14 (1994) 1308-4317
- [40] S. Potier and C. Psarropoulou, Endogenous acetylcholine facilitates epileptogenesis in immature rat neocortex, *Neurosci. Lett.*, 302 (2001) 25-28.
- [41] C. Psarropoulou and M. Avoli, Developmental features of 4-aminopyridine induced epileptogenesis, *Dev. Brain Res.*, 94 (1996) 52-59.
- [42] C. Psarropoulou and F. Dallaire, Activation of muscarinic receptors during blockade of GABAA-mediated inhibition induces synchronous epileptiform activity in immature rat hippocampus, *Neuroscience* 82 (1998) 1067-1077
- [43] C. Psarropoulou and S. Descombes, Differential bicuculline-induced epileptogenesis in rat neonatal, juvenile and adult CA3 pyramidal neurons in vitro, *Dev. Brain Res.*, 107 (1998) 285-290
- [44] C. Psarropoulou, J. Beaucher and C. Harnois, Comparison of the effects of M1 and M2 muscarinic receptor activation in the absence GABAergic inhibition in immature rat hippocampal CA3 area, *Dev. Brain Res.*, 107

- (1998) 285-290.
- [45] C. Psarropoulou, M. Boivin and M. Laudadio, Nicotinic effects on excitatory synaptic responses in the immature CA3 area of rat hippocampal slices., *Exp. Brain Res.*, in press (2003).
- [46] J. Qian, P. Saggau, Presynaptic inhibition of synaptic transmission in the rat hippocampus by activation of muscarinic receptors: involvement of presynaptic calcium influx., *Br. J. Pharmacol.*, 122 (1997) 511-519.
- [47] B. Rorig, G. Klaus and B. Sutor, Intracellular acidification reduced gap junction coupling between immature rat neocortical pyramidal neurones, *J. Physiol.*, 490 (1996) 31-49
- [48] F. Ross, Gwyn P., D. Spanswick and S. Davies, Carbenoxolone depresses spontaneous epileptiform activity in the CA1 region of rat hippocampal slices, *Neuroscience*, 100 (2000) 789-796
- [49] S. Rouse, M. Marino, L. Potter, P. Conn and A. Levey, Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits, *Life Sci.*, 64 (1999) 501-509.
- [50] R. Rozental, M. Srinivas and D. Spray, How to close a gap junction channel. Efficacies and potencies of uncoupling agents, *Methods Mol. Biol.*, 154 (2001) 447-476.
- [51] P. Rutecki, U. Sayin, Y. Yang and E. Hadar, Determinants of ictal epileptiform patterns in the hippocampal slice, *Epilepsia*, 43 Suppl 5 (2002) 179-183
- [52] M. Samoilova, J. Li, M. Pelletier, K. Wentlandt, Y. Adamchik, C. Naus and P.

- Carlen, Epileptiform activity in hippocampal slice cultures exposed chronically to bicuculline: increased gap junctional function and expression, *J. Neurochem.*, 86 (2003) 687-699
- [53] T. Seeger and C. Alzheimer, Muscarinic activation of inwardly rectifying  $K^{+}$  conductance reduces EPSPs in rat hippocampal CA1 pyramidal cells, *J. Physiol.*, 535 (2001) 383-396.
- [54] M. Segal, Presynaptic cholinergic inhibition in hippocampal cultures, *Synapse*, 4 (1989) 305-312.
- [55] C. Silvat-Barrat, M. Szente, C. Menini, J. Velluti and J. Champagnat, Muscarinic depression of synaptic transmission in the epileptogenic GABA withdrawal syndrome focus, *J. Neurophysiol.*, 85 (2001) 2159-2165
- [56] M. Smith, A. Pereda, Chemical synaptic activity modulates nearby electrical synapses, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 100 (2003) 4849-4854
- [57] D. Spray, A. Harris and M. Bennett, Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH, *Science*, 211 (1981) 712-715.
- [58] F. Strata, M. Atzori, M. Molnar, G. Ugolini, F. Tempia and E. Cherubini, A pacemaker current in dye-coupled hilar interneurons contributes to the generation of giant GABAergic potentials in developing hippocampus, *J. Neurosci.*, 17 (1997) 1435-1446
- [59] B. Sutor, Gap junctions and their implications for neurogenesis and maturation of synaptic circuitry in the developing neocortex, *Results Probl. Cell. Differ.*, 39

(2002) 53-73

- [60] J. Swann and R. Brady, Penicillin-induced epileptogenesis in immature rat CA3 hippocampal pyramidal cells, *Dev Brain Res.*, 12 (1984) 243-254.
- [61] J. Swann and J. Hablitz, Cellular abnormalities and synaptic plasticity in seizure disorders of the immature nervous system, *Ment. Retard Dev. Disabil. Res. Rev.*, 6 (2000) 258-267.
- [62] M. Theis, G. Sohl, D. Speidel, R. Kuhn, K. Willecke, Connexin43 is not expressed in principal cells of mouse cortex and hippocampus, *Eur.J. Neurosci.*, 18 (2003) 267-274
- [63] Y. Tsau, Y., Guan, L. and Wu, J., Epileptiform activity can be initiated in various neocortical layers: an optical imaging study, *J. Neurophysiol.*, 82 (1999) 1965-1973.
- [64] D. Umbriaco, K. Watkins, L. Descarries, C. Cozzari, and B. Hartman, Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex: an electron microscopic study in serial sections, *J. Comp. Neurol.*, 348 (1994) 351-373.
- [65] V. Valenzuela and L. Benardo, An in vitro model of persistent epileptiform activity in neocortex, *Epilepsy Res.*, 21 (1995) 195-204
- [66] C. Vidal and J. Changeux, Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex in vitro, *Neuroscience*, 56 (1993) 23-32.

- [67] I. Vilagi, N. Klapka, H. Luhmann, Optical recording of spreading depression in rat neocortical slices, *Brain Res.*, 898 (2001) 288-296
- [68] L. Yang and L. Benardo, Epileptogenesis following neocortical trauma from two sources of disinhibition, *J. Neurophysiol.*, 78 (1997) 2804-2810.
- [69] L. Yang and L. Benardo, Role of electrotonic coupling in epileptiform activities in rat neocortex, e-version, *Soc. Neurosci. Abstr* (2001) 559.5

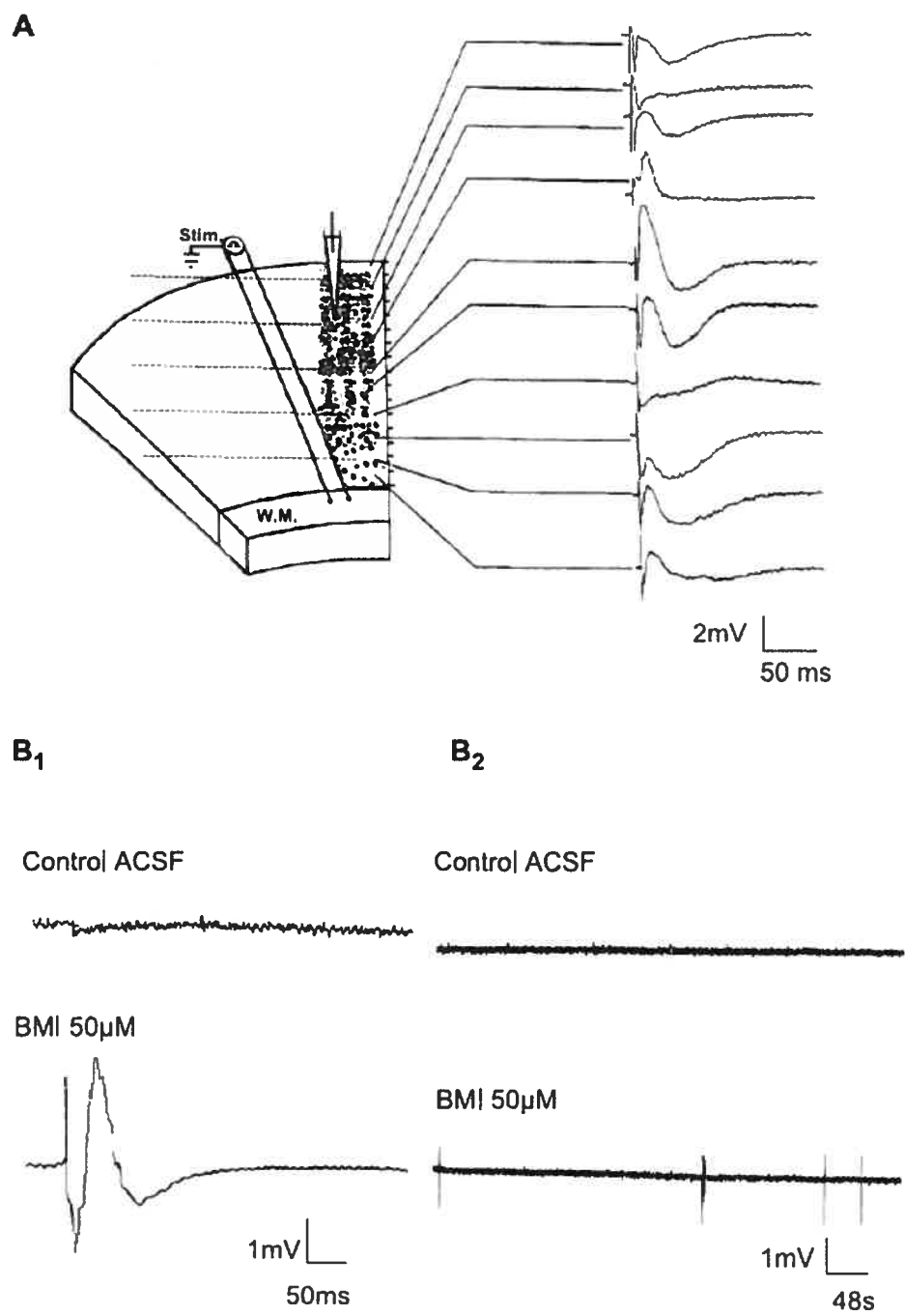


Figure 1



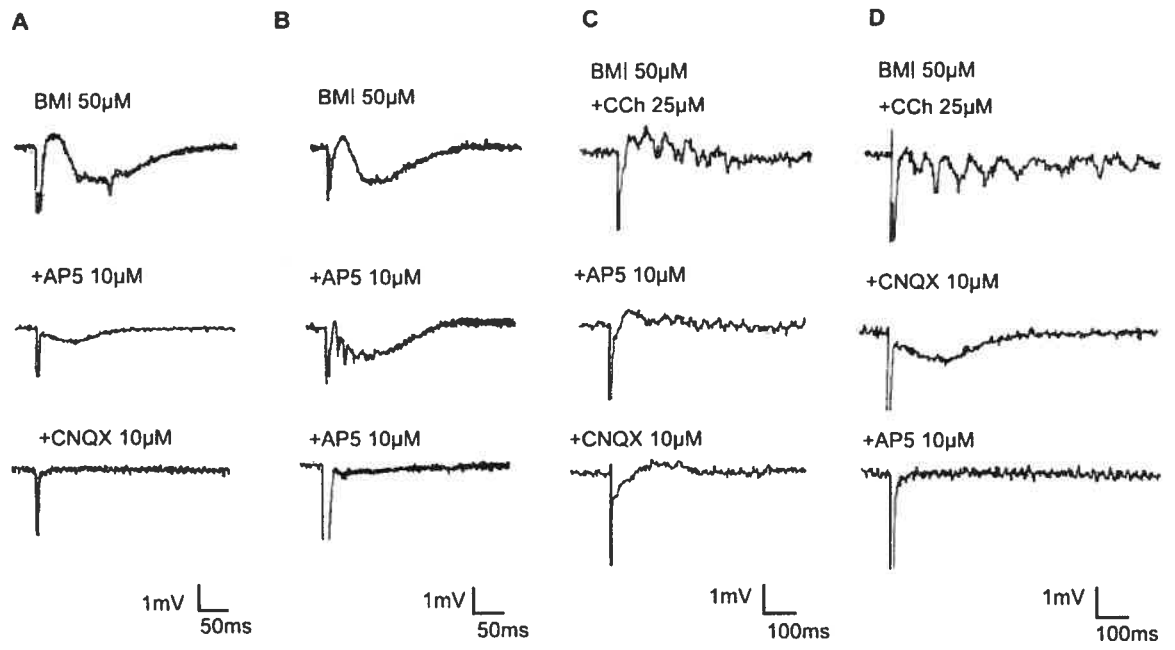
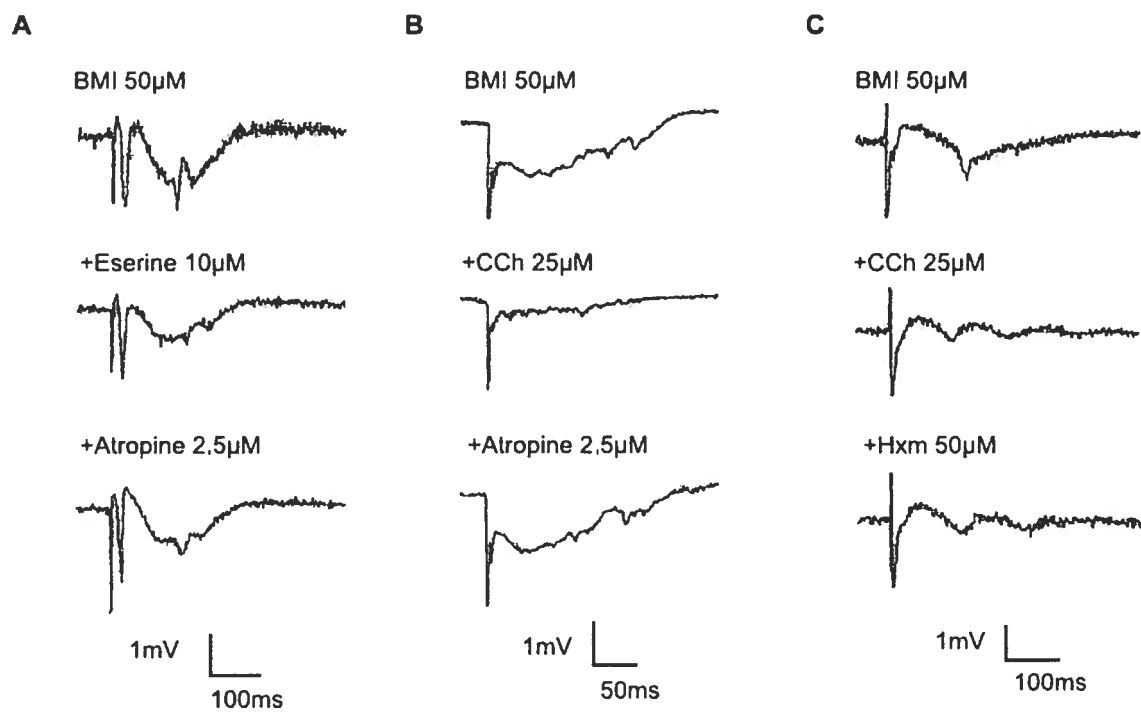


Figure 2

**Figure 3**

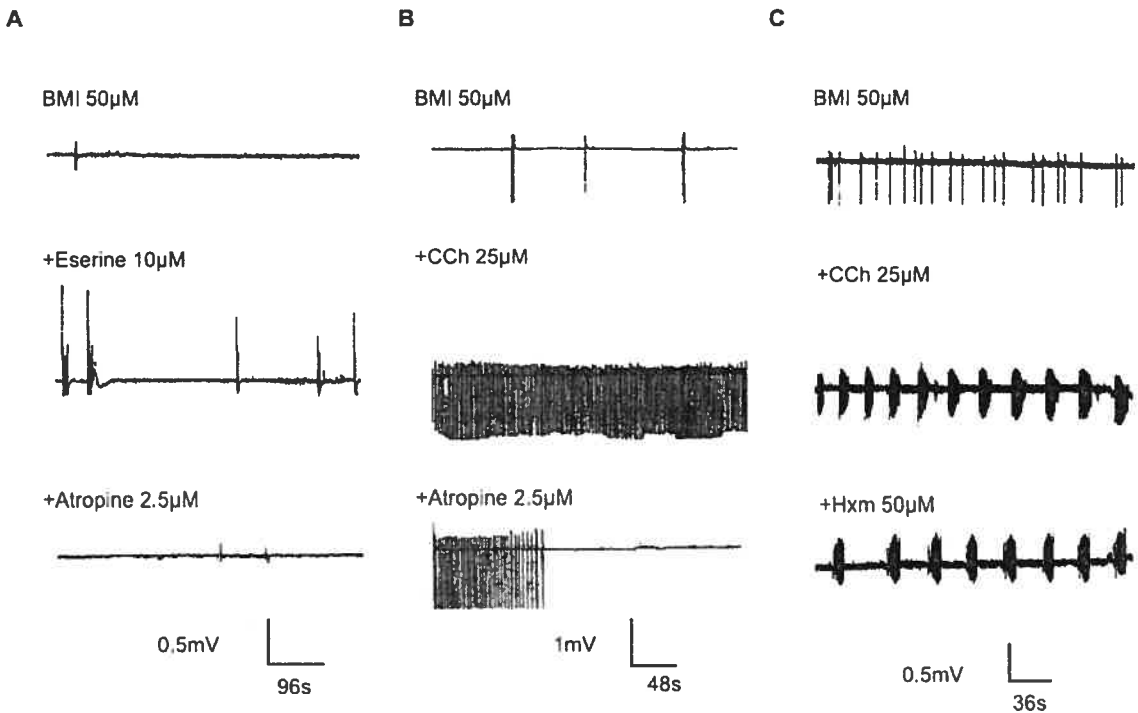


Figure 4

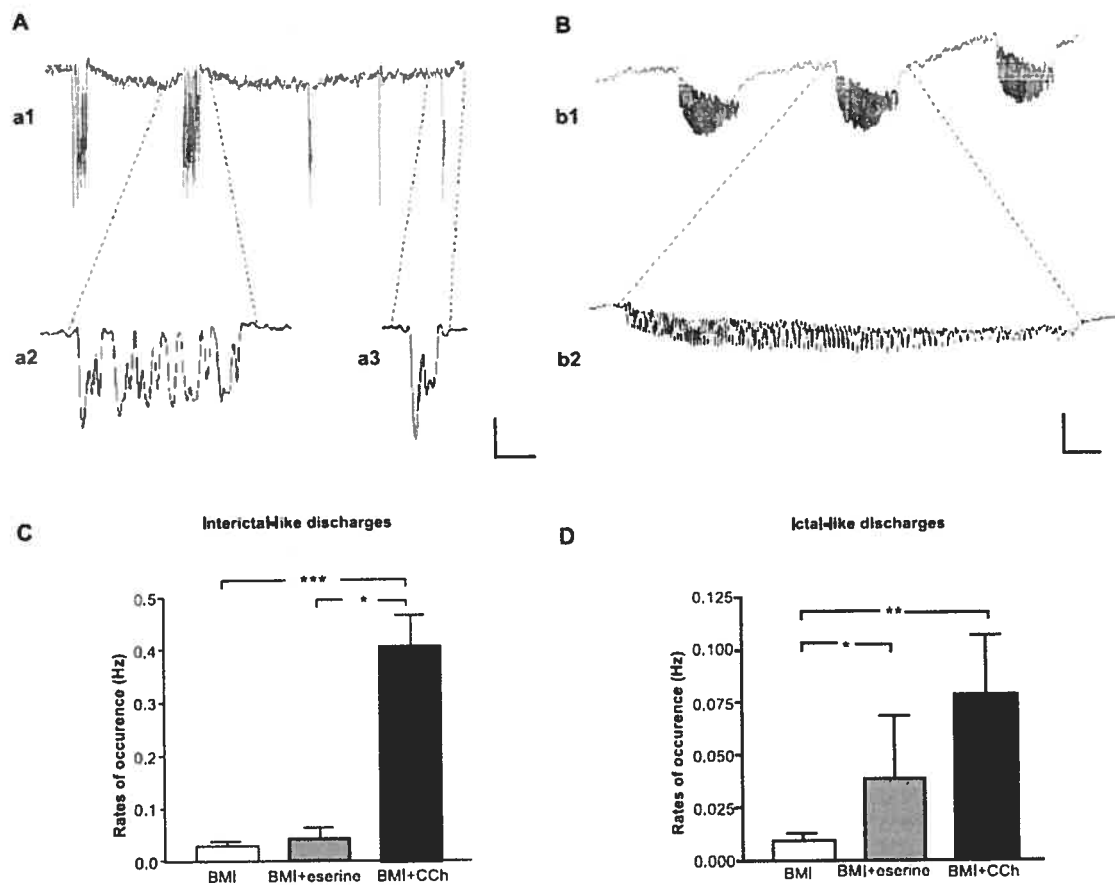
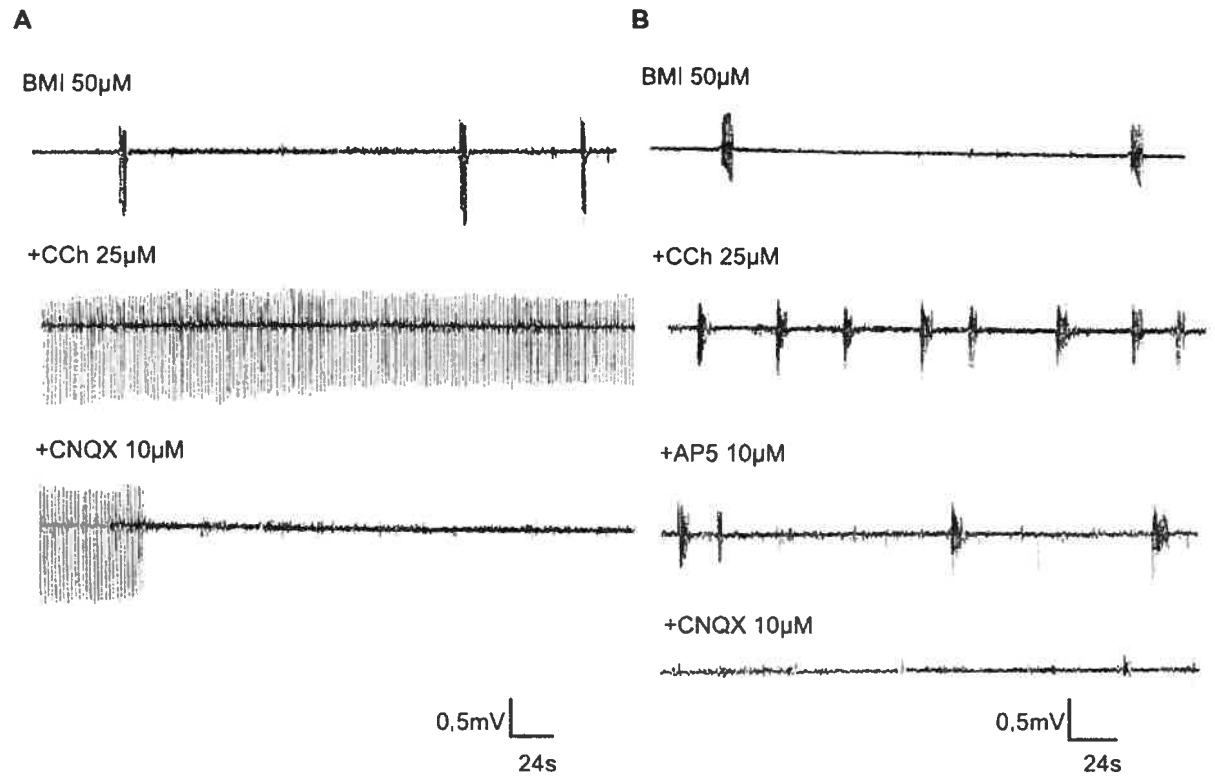


Figure 5

**Figure 6**

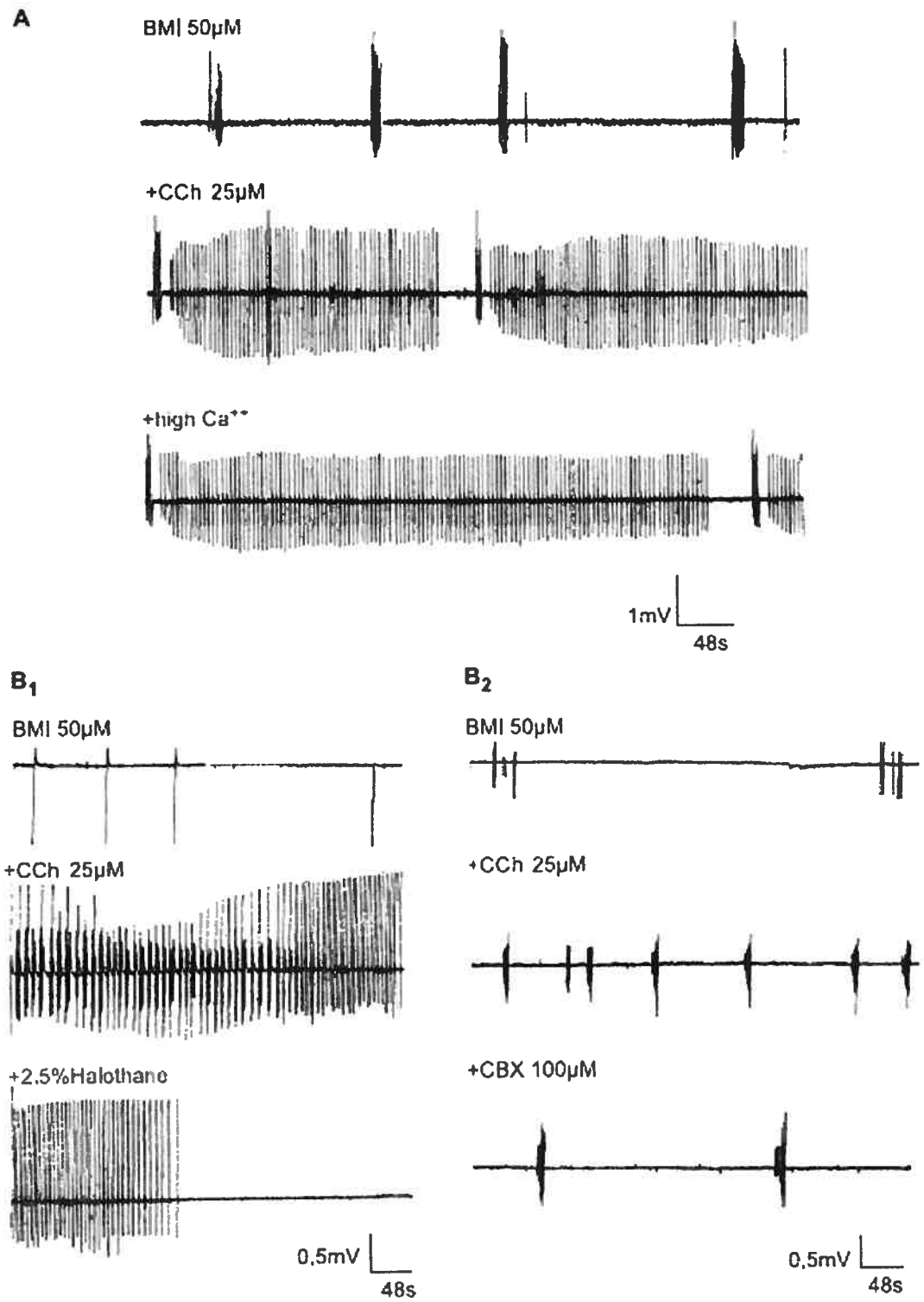


Figure 7

À titre de coauteur de l'article "Modulation of muscarinic facilitation of epileptiform discharges in immature rat neocortex." (Soizic Potier & Caterina Psarropoulou (2004). Brain Res 997(2): 194-206), je suis d'accord pour que Soizic Potier inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Modulation cholinergique de l'activité épileptiforme dans le cortex de rat, et conséquences à long terme de crises précoces expérimentales dans le cortex et l'hippocampe de rat"

C. PSARROPOULOU

Coauteur

  
Signature

24 Nov 2004

Date

## Chapitre IV

***A PENTYLENETETRAZOLE-INDUCED  
GENERALIZED SEIZURE IN EARLY LIFE  
ENHANCES THE EFFICACY OF  
MUSCARINIC RECEPTOR COUPLING TO  
G-PROTEIN IN HIPPOCAMPUS AND  
NEOCORTEX OF ADULT RAT***

Potier, S., Sénécal, J., Chabot, JG., Psarropoulou, C. & Descarries, L.,  
Soumis à European Journal of Neuroscience, 2004

En tant que premier auteur de cet article, j'ai effectué certaines des expériences nécessaires à sa rédaction (environ 1/3) et l'analyse de l'ensemble des résultats présentés ; j'ai par ailleurs rédigé cet article sous la supervision de ma directrice et de mon codirecteur de recherche



A PENTYLENETETRAZOLE-INDUCED GENERALIZED SEIZURE IN EARLY  
LIFE ENHANCES THE EFFICACY OF MUSCARINIC RECEPTOR COUPLING  
TO G-PROTEIN IN HIPPOCAMPUS AND NEOCORTEX OF ADULT RAT

**Soizic POTIER<sup>a,b</sup>, Jacques SÉNÉCAL<sup>b,c</sup>, Jean-Guy CHABOT<sup>e</sup>, Caterina  
PSARROPOULOU<sup>a,b,d,\*</sup> and Laurent DESCARRIES<sup>b,c,d</sup>**

<sup>a</sup> Ste-Justine Hospital Research Centre & Dept of Pediatrics, <sup>b</sup> Dept of Physiology, <sup>c</sup>  
Dept of Pathology and Cellular Biology, <sup>d</sup> Centre de recherche en sciences  
neurologiques, Faculty of Medicine, Université de Montréal,

and

<sup>e</sup> Douglas Hospital Research Centre, Dept of Psychiatry, McGill University,  
Montreal, Québec, Canada

32 pages (including 4 tables) + 2 figures

7848 words total: 227 in Abstract, 468 in Introduction

Corresponding author: L. Descarries  
Department of Pathology and Cell Biology  
Faculty of Medicine  
Université de Montréal  
CP 6128, Succursale Centre-ville  
Montréal (QC) Canada H3C 3J7

tel. (514) 343-7070  
fax (514) 343-5755

Running title: **Early seizures and muscarinic receptors**

Keywords: Muscarinic receptors, binding, mRNA, G-protein coupling, epileptogenesis

\* Present address : Dept of Biological Applications and Technologies  
University of Ioannina  
Ioannina 45110, Greece

### ABSTRACT

We have previously shown that exposure to the anticholinesterase eserine provokes interictal-like discharges in the CA3 area of hippocampal slices from adult rats in which a generalized seizure has been induced by pentylenetetrazole (PTZ) when immature (at 20 days). Such increased responsiveness to acetylcholine was not associated with any change in hippocampal ACh or GABA content, GABAergic inhibition or density of ACh innervation, but was blocked by the muscarinic receptor antagonist atropine. We therefore turned to quantitative radioligand binding autoradiography, in situ hybridization and the [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S method to assess the properties of hippocampal and neocortical muscarinic receptors in adult rats having experienced a PTZ seizure at P20. The densities of M1 and M2 receptor binding sites respectively labeled with [<sup>3</sup>H]pirenzepine and [<sup>3</sup>H]AFDX-384, as well as the amount of m1, m2 and m3 receptor mRNAs, did not differ from control in the hippocampus and neocortex of these rats. In contrast, in PTZ rats, both brain regions displayed a marked increase in [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation stimulated by acetylcholine, bethanechol and particularly oxotremorine. This finding indicates that a generalized seizure in immature rat can entail a long-term and presumably permanent increase in the efficacy of G-protein coupling to muscarinic receptors in the hippocampus and neocortex of the adult. By analogy, such a mechanism could account for the susceptibility to epilepsy of human adults having suffered from prolonged convulsions in early life.

## INTRODUCTION

Most seizure types have an early onset in life (Woodbury, 1977; Hauser *et al.*, 1993), a fact perhaps related to the increased response of brain to epileptogenic stimuli during CNS maturation (Swann & Hablitz, 2000). However, relatively little is known about the long-term consequences of early seizures in brain (for review, see (Huang *et al.*, 2002). In rat, pentylenetetrazole (PTZ), an agent that acts at the type A  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA<sub>A</sub>) receptor picrotoxin site (Ramanjaneyulu & Ticku, 1984; Huang *et al.*, 2001), and blocks the chloride channel associated to this receptor (Squires *et al.*, 1984) causes seizures that model primary generalized epilepsy (Loscher *et al.*, 1991; Kubova & Moshe, 1994). We have shown earlier that a single generalized seizure induced by administration of PTZ during the postnatal period entails synchronous interictal-like discharges in adult rat hippocampal slices (CA3 area) exposed to the acetylcholinesterase inhibitor, eserine (Meilleur *et al.*, 2000; Meilleur *et al.*, 2003). Interestingly, this abnormal activity occurred with much higher frequency in slices and rats injected with PTZ at P20 compared to P10, increased progressively with the delay post-injection (up to 7 months), and did not persist with time in animals injected as adults. These studies also demonstrated that the epileptiform discharges took place in the absence of any change in hippocampal GABA or acetylcholine (ACh) content as measured by high performance liquid chromatography, in density of ACh innervation as quantified with ChAT-immunocytochemistry, or in effectiveness of GABAergic inhibition or glutamate excitation, as assessed by intracellular recording. Moreover, the eserine-induced interictal spikes were abolished by application of the muscarinic

antagonist atropine, clearly implicating muscarinic receptors in their generation (Meilleur *et al.*, 2003).

Muscarinic receptors are classified in four (M1-M4) or five subtypes (m1-m5) according to their pharmacological profile and molecular structure, respectively (Dorje *et al.*, 1991; Levey *et al.*, 1991). They all belong to the superfamily of G-protein-coupled, seven transmembrane domain proteins, and display a very high degree of sequence homology between receptor subtypes (for review, see (Felder *et al.*, 2000; Volpicelli & Levey, 2004)). In the present study, three methods were used to assess the properties of these receptors in the hippocampus and neocortex of adult rat following a PTZ seizure at P20: the density of M1-M2 receptor sites was measured by quantitative ligand binding autoradiography; that of m1-m3 muscarinic receptors mRNA by *in situ* hybridization, and the efficacy of G-protein coupling as stimulated by muscarinic agonists with the [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S autoradiographic technique.

Also, because of earlier reports suggesting gender differences in the regional density of muscarinic binding sites in brain (Dohanich *et al.*, 1982; Olsen *et al.*, 1988; El-Bakri *et al.*, 2002) or susceptibility of adult female rodents to PTZ-induced seizures (e.g., (Kokka *et al.*, 1992) but see (Medina *et al.*, 2001)), care was also taken to analyze the data from male and female rats separately.

## MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures abided by the institutional policy and guidelines for animal use and care of Ste-Justine Research Center and the Université de Montréal.

### **Animals**

The study was carried out on twenty five female and twenty two male Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, QC, Canada). At age 20 days (P20), 17 male and 22 female pups were given a single once intraperitoneal injection of the GABA<sub>A</sub> antagonist PTZ (RBI, Oakville, ON, Canada) (70-80 mg/kg), dissolved in 0.9% NaCl solution. Five male and three female littermates were kept as controls. All rats were monitored visually for 4 h before they were returned to their home cage.

Seizure activity was induced by PTZ in most rats, with a delay of onset, severity rate and mortality rate (12%) that was not significantly different between males and females. Only rats having displayed a generalized seizure lasting more than 20 min (status epilepticus or stage 5 on the seizure severity scale of Pohl and Mares (Pohl & Mares, 1987)) were kept : 8 of 17 males and 4 of 22 females.

### **Tissue**

Forty days later (at P60), the rats were decapitated under isoflurane anesthesia (inhalation). The brain was rapidly removed, frozen in 2-methylbutane cooled to -40°C for 20 s and kept at -80 °C until use. In each rat, twenty µm-thick cryostat sections were obtained from a transverse plane approximating IA 4.7 mm according to

Paxinos and Watson (1986). All sections were thaw-mounted onto Superfrost Plus™ slides (Fischer Scientific, Nepean, ON, Canada) and were stored at -80°C.

### **Ligand binding autoradiography of M1 and M2 muscarinic receptors**

Sections from every rat were warmed at room temperature and pre-incubated for 15 min in Tris-HCl (50 mM; pH 7.4) buffer. They were then incubated for 90 minutes in the same buffer containing 10 nM of either the selective M1 receptor antagonist [<sup>3</sup>H]pirenzepine (79 Ci/mM, PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada), or the selective M2 receptor antagonist [<sup>3</sup>H]AFDX-384 (120 Ci/mM, PerkinElmer), in the presence or absence of the non-selective antagonist atropine (10 μM) to measure non specific labeling (e.g., Hoglund & Baghdoyan 1997). The autoradiographs were produced on Kodak Biomax™ MS film, with or without a TranScreen™, and developed with GBX™ (Kodak) after 4 and 12 weeks of exposure, respectively (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada).

Optical density measurements were obtained with an MCID™ image analysis system (Imaging Research, St. Catharines, ON, Canada). Specific binding was calculated by digital subtraction of the non-specific labeling from the total binding. Standard curves generated from [<sup>3</sup>H]microscales (Amersham Biosciences) were used to convert optical densities into femtomoles per milligram of protein. Multiple (20-100) readings were obtained from the primary somatosensory cortex (Pari), retrosplenial cingulate cortex (Cg), and the CA1 and CA3 sectors of dorsal hippocampus, in 4-6 sections per condition per rat.

### **In situ hybridization in of m1-m3 muscarinic receptor mRNA**

[<sup>35</sup>S]-labeled riboprobes complementary to human m1, m2 and m3 muscarinic receptor cDNA sequences (Bonner *et al.* 1987) were used. They bind to 0.24-0.5 kb cDNA nucleotides of the large cytoplasmic loop between transmembrane regions 5 and 6, which does not significantly differ from those of the rat (Bonner *et al.*, 1987; Buckley *et al.*, 1988). Except for the m2 mRNA, *in situ* hybridization was performed on adjacent sections using antisense and sense riboprobes of each muscarinic receptor subtype mRNA to establish signal specificity. All probes were transcribed and labeled using an RNA transcription kit. Antisense riboprobes were synthesized using SP6 RNA polymerase. The sense-strand control probes were generated by T7 RNA polymerase. Both antisense and sense riboprobes were labeled directly during the RNA polymerase reaction using [<sup>35</sup>S]uridine 5'-( $\alpha$ -thio)triphosphate ([<sup>35</sup>S]UTP $\alpha$ S, 1,250 Ci/mmol, PerkinElmer).

*In situ* hybridization was performed as previously described (Danik *et al.*, 1993) on two sections per riboprobe from 9 PTZ (6 males and 3 females) and 6 control rats (3 males and 3 females). All sections were processed simultaneously, in order to avoid inter-experiment variations. Briefly, frozen sections were warmed to room temperature and fixed with 4% paraformaldehyde in 12 mM PBS for 30 min followed by three washes in PBS. Sections were digested with proteinase K (1  $\mu$ g/ml) for 10 min at 37°C, acetylated with acetic anhydride 0.25% (v/v) in 100 mM triethanolamine (pH 8.0) for 10 min at room temperature, before being dehydrated in ethanol and air-dried at room temperature. Hybridization was carried out overnight at 57°C under coverslips in 50% formamide, 0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1X Dendhardt's

solution, 500 µg/ml yeast tRNA, 10% dextran sulfate and 100 mM dithiothreitol containing  $1 \times 10^7$  CPM/mL [ $^{35}\text{S}$ ]UTP-labeled antisense or sense riboprobes. Thereafter, coverslips were removed and the sections were washed 3 times for 15 min in 4x SSC containing 14 mM 2-mercaptoethanol and 1%, sodium thiosulfate at room temperature. Slides were then incubated with RNase A (20 µg/ml) and T1 (1 U/ml) for 30 min at 37°C in 0.5 M NaCl, Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) and 1 mM EDTA. Final washes were carried out successively in RNase buffer (for 30 min at 37°C), 2 x SSC (30 min at room temperature), 0.1 x SSC (for 30 min at 55°C), and 0.1 x SSC (for 30 min at room temperature). After dehydration in graded ethanol containing 300mM ammonium acetate, the sections were air-dried, placed into X-ray cassettes with Kodak Biomax MR<sup>TM</sup> films for one month, and developed with Kodak GBX<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences).

Optical density measurements were obtained with the image analysis system, as above, from Par1, Cg, the pyramidal layer of CA1-CA3 and the granular layer of the dentate gyrus of dorsal hippocampus. Standard curves generated from [ $^{14}\text{C}$ ]microscales (Amersham Biosciences) were used to convert optical densities into nCi per milligram of protein after correction for the specific activity of [ $^{35}\text{S}$ ]UTP at the calibration date and the decay factor of [ $^{35}\text{S}$ ] (Dupuis *et al.*, 1998). Specific hybridization for m1 and m3 was calculated by digital subtraction of sense strand control probe labeling from antisense labeling.



### **[<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S autoradiography of muscarinic receptor-activated G protein coupling**

Autoradiography of basal and muscarinic receptor agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation was performed as previously described (Sim and Childers, 1997, Adlersberg *et al.*, 2000), with minor modifications, on sections from 8 control and 12 PTZ rats. After soaking for 15 min in 50 mM Tris-HCl buffer (50mM; pH 7.4), all sections were preincubated in Tris-HCl buffer containing NaCl (100 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), EGTA (0.2 mM), A1 adenosine receptor antagonist DPCPX (10  $\mu$ M) and 2 mM GDP, according to (Laitinen, 1999) and (Harrison & Traynor, 2003). [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (40 pM; 1250 Ci/mmol; PerkinElmer) was then added, and the slides were incubated for 2 h in the presence or absence of 100  $\mu$ M acetylcholine chloride, bethanechol chloride or oxotremorine (all from Sigma, Oakville, ON, Canada). Adjacent sections were incubated with unlabeled GTP $\gamma$ S (10  $\mu$ M) to measure non-specific labeling. In a complementary experiment, sections from 7 control and 8 PTZ rats were incubated with oxotremorine as above, but in presence of 100  $\mu$ M of the non-selective muscarinic antagonist atropine added to the preincubation medium. The autoradiographs were again produced on Kodak Biomax<sup>TM</sup> MS film (Amersham Biosciences) and developed with GBX<sup>TM</sup>(Kodak), after 3 to 7 days of exposure.

Optical density readings were obtained as after ligand binding autoradiography, from Par1, Cg and the CA1 and CA3 sectors of dorsal hippocampus. The standard curves generated from [<sup>14</sup>C]microscales (Amersham Biosciences) were used as described above (*in situ* hybridization), to convert optical density readings into femtomoles per milligram of protein after subtraction of the non-specific labeling.

## Statistics

GraphPad™ (Prism Software, San Diego, CA, USA) was used for all statistical comparisons. Difference in regional density of muscarinic binding sites or muscarinic receptor mRNA between control and PTZ-treated rats were analyzed by one-tailed Student's *t* test. Differences between regions and differences between basal and agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS incorporation were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. A two-tailed Student's *t* test was used to analyze differences between male and female rats in any given condition.

## RESULTS

### Muscarinic receptor binding in control and PTZ rats

In all four brain regions examined at P60 (Par1, Cg, CA1 and CA3), the density of specific binding to M1 ([<sup>3</sup>H]pirenzepine) and M2 receptors ([<sup>3</sup>H]AFDX-384) was not significantly different between control and PTZ rats (Table 1, males and females of each set pooled together). In keeping with earlier reports, the density of M1 receptor sites was greater than that of M2 in both hippocampus and neocortex (Cortes & Palacios, 1986; Mash & Potter, 1986; Spencer *et al.*, 1986; Narang, 1995; Gattu *et al.*, 1997). The order of distribution of the M1 (CA1>Par1>CA3>Cg) and M2 (Par1>CA1>Cg>CA3) binding sites was also comparable to that found previously (Narang, 1995; Zhang *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2003). The specific binding to M1 receptors was higher in CA1 of male compared to female rats ( $p < 0.05$ ), but there were no significant differences between control and PTZ rats, when males and females were analyzed separately.

### **Muscarinic receptor mRNA in control and PTZ rats**

As shown in Table 2, there were no statistically significant differences in m1, m2, and m3 receptor mRNA levels between control and PTZ rats in the four brain regions examined (Par 1, Cg, pyramidal layer of CA1-CA3, Pyr; granular layer of dentate gyrus, Gr). m1 mRNA levels were the highest in all regions, particularly in the cell layers of hippocampus. m2 mRNA levels were roughly equivalent to m1 levels in Cg, but twice lower in Par 1, and 6 to 9 times lower in Pyr and Gr, respectively, even if unspecific labeling had not been measured and subtracted from total hybridization in the case of this receptor. m3 mRNA levels were the lowest in all regions, except in Pyr, where they were almost twice higher than m2, even though 3.4 times lower than m1. The average level of m3 mRNA was significantly higher in males than females ( $p < 0.05$ ), but again, there were no differences between control and PTZ rats when males and females were analyzed separately.

### **Muscarinic agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation in control and PTZ rats**

The levels of basal [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation (e.g., Fig. 1) were similar in all regions examined (Par1, Cg, CA1 and CA3) and not significantly different between control and PTZ rats when data from male and female rats were pooled together (data not shown). We therefore expressed and compared the results as “percent of agonist-stimulated over basal”, as shown in Table 3.

In all rats, the levels of over basal activation were consistently higher in the two cortical areas than hippocampus. In control rats, there were no statistically significant differences between agonists in each region. In PTZ rats, every region displayed a stronger activation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation than in control, with differences

reaching statistical significance after both acetylcholine and oxotremorine stimulation (Table 3). The differences from control after acetylcholine activation were statistically significant in Par 1 and CA1 ( $p < 0.05$ ). The highest levels of stimulation were induced by oxotremorine and significantly different from control in all four regions ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ). Oxotremorine-stimulated increases of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S incorporation were markedly lowered by preincubation with the non-selective muscarinic antagonist atropine in both control and PTZ rats, from 65% in CA3 of controls to 93% in Par1 of PTZ rats (Table 4).

When analyzed separately in male and female rats, the basal level of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S incorporation was consistently lower in males than females in both control and PTZ rats (white columns of respective graphs in Fig. 2). This difference reached statistical significance in the Cg of control ( $p < 0.05$  in A versus B) and Par1 of PTZ rats ( $p < 0.05$  in C versus D). Upon activation by oxotremorine, the total level of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S incorporation was slightly higher in females compared to males of either group (compare black columns in the respective graphs), but not significantly greater when expressed as percent increase over-basal because of the higher basal level.

## DISCUSSION

The major finding of this study was that a generalized seizure induced by PTZ in 20-day-old rat leads to a long-term increase in the efficacy of G-protein coupling of muscarinic receptors in the hippocampus and neocortex of adults, without any apparent change in the affinity and number, nor in the expression of these receptors. This

increase in efficacy of G-protein coupling, occurring in both male and female rats with apparently similar magnitude, presumably accounts for the occurrence of interictal like discharges in hippocampal slices from adult rat exposed to the acetylcholinesterase inhibitor, eserine.

### **The pentylenetetrazole seizure model**

As previously reported in detail (Meilleur *et al.*, 2000; Meilleur *et al.*, 2003), PTZ quickly and reliably induced generalized seizures in P20 rats (Velisek *et al.*, 1992), owing to its low convulsant CD<sub>50</sub> (Velisek *et al.*, 1992), complete bioavailability in the rat CNS, and lack of age-dependent, systemic differences in kinetics (Zecevic *et al.*, 1989). Even if widely used in animals to generate seizures that mimick generalized clonic seizures in human (Shehab *et al.*, 1992; Andre *et al.*, 1998), the mechanisms through which PTZ exerts this effect are still incompletely understood (Huang *et al.*, 2001; Eloqayli *et al.*, 2003). As a non-competitive GABAergic receptor antagonist binding to the picrotoxin site of post-synaptic GABA<sub>A</sub> receptors (Ramanjaneyulu & Ticku, 1984; Huang *et al.*, 2001), PTZ blocks Cl<sup>-</sup> influx and may therefore suppress inhibitions mediated by this receptor complex. This should lead to facilitated neuronal depolarizations (De Deyn & Macdonald, 1989; Bradford, 1995), allowing the propagation and maintenance of epileptic seizures through a wide circuitry involving the reticular formation, diencephalic regions such as the anterior medial thalamus and caudal hypothalamus, and bulbar regions at the origin of descending motor pathways to the spinal cord. (Miller *et al.* 1987).

PTZ seizures are believed to alter brain neurotransmitter homeostasis (Szyndler *et al.*, 2002; Eloqayli *et al.*, 2003) and to rapidly induce the transient expression of immediate early genes encoding transcription factors (Yount *et al.*, 1994; Cole *et al.*, 2002). While the chronic administration of subconvulsive doses of PTZ (or kindling) is associated with various neurochemical, neurophysiological and behavioural modifications (Schroder *et al.*, 1993), the long-term effects of its acute administration are less well documented.

In our previous studies (Meilleur *et al.*, 2000; Meilleur *et al.*, 2003), we assessed the long-term consequences of an early generalized PTZ seizure by extracellular and intracellular recording in hippocampal slices from adult rat. These experiments highlighted the occurrence of interictal-like discharges in the CA3 area of eserine-treated slices from the rats having experienced the PTZ seizure at P20. Such epileptiform activity was never observed in eserine-treated slices from naive rats, and was blocked in the presence of atropine, which clearly implicated muscarinic receptors in its triggering. It could also be inferred that this hyperexcitability was not the result of some neurotoxic effect of PTZ but a consequence of the early epileptic episode itself, since it was not found in rats that had been pretreated with pentobarbital to prevent the occurrence of the seizure at the time of PTZ injection (Meilleur *et al.*, 2003). This was an additional reason to consider the PTZ model as particularly valuable for searching possible cellular mechanisms responsible for the greater susceptibility to epilepsy of adult animals having sustained a generalized seizure in early life (Volpe, 1989; Bernes & Kaplan, 1994; Mizrahi & Clancy, 2000).

### **Muscarinic receptor affinity, density and expression are not permanently affected by the occurrence of a PTZ seizure during development**

The present measurements of the regional density of M1 and M2 binding sites in adult rat hippocampus and neocortex were in keeping with previously published data (Cortes & Palacios, 1986; Mash & Potter, 1986; Spencer *et al.*, 1986; Araujo *et al.*, 1989; Volpicelli & Levey, 2004), notably the higher density of M1 than M2 sites, as respectively labeled with tritiated pirenzepine and AFDX-384, in both hippocampus and neocortex. The ontogenesis of central muscarinic receptors appears to be completed by the seventh postnatal week in rat (Ben-Barak & Dudai, 1979; Aubert *et al.*, 1996), after which the density of these binding sites decreases progressively with age throughout brain (Tayebati *et al.*, 2002). This could explain that lower estimates of hippocampal and neocortical M1 and M2 receptor density were also reported in studies carried out in rats aged 3 to 25 months (Narang, 1995; Zhang *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2003).

The lack of difference in density of M1 and M2 binding sites between control and PTZ rats in both hippocampus and neocortex indicated that neither a change in the affinity nor in the number of these receptors was responsible for the enhanced neuronal responsiveness to endogenous acetylcholine recorded in the hippocampal slices from the PTZ rats. It was therefore clear that the generalized convulsion in early life had not permanently modified these characteristics of M1 or M2 receptors, even if these receptors may undergo transient changes following repetitive administration of subconvulsive doses of PTZ in adult rat (Serra *et al.*, 1997). The present negative

results were also in keeping with the reported lack of nerve cell death in hippocampus following acute PTZ administration (Planas *et al.*, 1994).

The levels of m1, m2 and m3 muscarinic receptor mRNA measured in this study were also consistent with earlier data (Brann *et al.*, 1988; Buckley *et al.*, 1988; Palacios *et al.*, 1990), notably the greater expression of m1 mRNA in the cellular layers of hippocampus than neocortex, and the relatively higher m3 mRNA level in the pyramidal layer of CA1-CA3 compared to the granular layer of dentate gyrus (Buckley *et al.*, 1988). m4 and m5 receptor mRNA were not measured in the present study, but the m4 protein accounts for less than 15% of muscarinic receptor protein in rat hippocampus and neocortex, whereas the level of m5 protein may be considered to be negligible by comparison with those of m1 and m2 protein (Vilaro *et al.*, 1990; Levey *et al.*, 1991; Levey, 1993).

The equivalent levels of m1, m2 and m3 muscarinic receptor mRNA in control and PTZ rats indicated that the generalized convulsion in early life had not caused a permanent alteration of the expression of these muscarinic receptor subtypes, i.e. of their processing, degradation or renewal. This was consistent with a number of earlier observations after PTZ seizures in adult rat, and notably the enhancement of early and late response gene transcription (Yount *et al.*, 1994) and decrease in expression of GABA<sub>A</sub> receptors (Walsh *et al.*, 1999), which were shown not to last more than 48 hours in rat brain. Similarly, a single PTZ seizure has been reported to decrease glutamate turnover in adult rat cerebellum, but only within a short period of time after the occurrence of the seizure (Eloqayli *et al.*, 2003).



### **Long-term enhancement of G-protein coupling efficacy of muscarinic receptors after an early PTZ seizure**

The greater activation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation by cholinergic agonists in both hippocampus and neocortex of PTZ compared to control rats was totally unexpected. This effect was particularly apparent after stimulation with oxotremorine. The lesser activation by acetylcholine and bethanechol than oxotremorine presumably reflects the pharmacological properties of these compounds. Acetylcholine is subject to acetylcholinesterase degradation (whereas bethanechol and oxotremorine are non-hydrolysable), and bethanechol is a partial agonist (Sharif *et al.*, 1995) much less potent than any of the other two (Birdsall *et al.*, 1978; Messer *et al.*, 1989). The almost complete lack of stimulation by oxotremorine after pretreatment of the slices with atropine confirmed the muscarinic specificity of this effect.

It is likely that much of the increase in oxotremorine activated [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation observed in the PTZ rats was imputable to the M1 rather than M2 muscarinic receptor subtype, even if this agonist presumably binds preferentially to M2 receptors (Dallanocce *et al.*, 1999). This could be inferred from the resulting electrophysiological effect, which was excitatory and not inhibitory. In both regions, M1 and M3 receptors are known to be linked to G<sub>q/11</sub>, whereas M2 and M4 are linked to G<sub>i</sub> proteins (Akam *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001). M1 and M3 activation are known to increase PLC, PLA<sub>2</sub> and PLD activity, as well as Ca<sup>++</sup> influx, in parallel with an inhibition of K<sup>+</sup><sub>M</sub> currents via the  $\alpha$  subunit of G<sub>q</sub> or G<sub>11</sub> proteins (for review see: Caulfield 1993), which results in neuronal depolarization and hyperexcitability (Brown *et al.*, 1997). There is also considerable indirect evidence that the selective activation

of M1 receptors potentiate excitatory transmission at pyramidal cells in hippocampus (reviewed in Volpicelli & Levey, 2004) or in neocortex (Cox *et al.*, 1994; Potier & Psarropoulou, 2004). In contrast, M2 and M4 activation lead to adenylyl cyclase and  $\text{Ca}^{++}$  influx inhibition, and to  $\text{K}^+_{\text{IR}}$  activation via  $\alpha$  and/or  $\beta/\gamma$  subunits of  $\text{G}_i$  proteins, which should result in neuronal hyperpolarization (Seeger & Alzheimer, 2001). It might be possible to substantiate the involvement of M1 receptors in the present model by quantification of the different G proteins or their mRNAs.

In view of the differences in susceptibility to seizures which have been reported between males and females, it would have been significant to observe a gender difference in efficiency of muscarinic receptor coupling to G-protein in the present model, especially since positron emission tomographic studies in human brain suggest the existence of a greater number of muscarinic receptors in female compared to male brain (Yoshida *et al.*, 2000). However, the statistical analysis of the present results indicated that the higher level of total [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding reached in the female rats upon activation with the cholinergic agonists was essentially due to a higher basal level of [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S incorporation. The reasons for this higher basal level of incorporation remain obscure, and could reflect the combined endogenous activity of a number of other G-protein-coupled receptors which are known to be more active in females than males (e.g., Michel *et al.*, 1995; Mermelstein *et al.*, 1996).

### **Concluding remarks**

How the enhanced muscarinic receptor coupling efficacy may be induced by an early seizure and result in a permanent increase in the electrophysiological

responsiveness of hippocampal neurons to endogenous acetylcholine remains to be established. Such a change could reflect a permanent modification in the regulation of one or more genes in the M1 receptor signaling cascade. G-protein mRNA levels were not measured in the present study, but it has been reported that kainic acid-induced seizures modulate G-protein expression in rat hippocampus, enhancing G<sub>s</sub> alpha and decreasing G<sub>o</sub> subunit mRNA levels in the dentate gyrus up to 30 days after the seizures (Lason & Przewlocki, 1994).

Muscarinic receptors are desensitized via phosphorylation on the third cytoplasmic loop and of serine and threonine amino-acids on their C-terminal tail, a mechanism which uncouples G-protein from the receptor (Van Koppen & Kaiser, 2003) and/or interacts directly with the G-protein (Dicker *et al.*, 1999). A PTZ seizure-induced inhibition of the enzymatic machinery that phosphorylates and desensitizes muscarinic receptors, such as G-protein coupled receptor kinases, PKC or casein kinase (Hosey *et al.*, 1996; Dicker *et al.*, 1999), might generate the increased coupling efficacy of muscarinic receptors observed in PTZ rats.

Irrespective of its cause, the long-term and presumably permanent increase in efficacy of G-protein coupling of muscarinic receptors resulting from a generalized seizure in early life could be particularly meaningful in terms of epileptogenesis. It could represent a novel mechanism to account for the subsequent occurrence of epilepsy in adults having experienced prolonged generalized convulsions in infancy, for example. Previous observations have led to believe that excessive activation of hippocampal muscarinic receptors might generate limbic seizures and even hippocampal damage in adult rat brain, notably in the pilocarpine model of epilepsy

(Turski *et al.*, 1983). A more recent study by Santos *et al.* (2000) has shown that the induction by pilocarpine of several episodes of status epilepticus in immature rats leads to ictal discharges in hippocampal slices of adults, but in the absence of structural damage.

The greater efficacy of muscarinic receptor coupling to G-proteins induced by early seizures could be particularly influential under conditions favoring increases in hippocampal and/or cortical ACh release. It could also have implications in relation with a variety of behavioral changes in which ACh appears to play a major role in human brain, and thus provide the beginning of an explanation for some of the alterations in cognitive processes that have been reported to affect patient suffering from epilepsy since childhood. Lastly, it might represent a novel target for the eventual development of new anticonvulsant drugs.

#### **Acknowledgments**

This study was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant 203714-02 to C.P. and by grant MOP 3544 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to L.D. The authors also thank Claude Gauthier for help in preparing the color-coded figure.

## REFERENCES

- Adlersberg, M., Arango, V., Hsiung, S., Mann, J.J., Underwood, M.D., Liu, K., Kassir, S.A., Ruggiero, D.A. & Tamir, H. (2000) In vitro autoradiography of serotonin 5-HT(2A/2C) receptor-activated G protein: guanosine-5'-(gamma-[<sup>35</sup>S]thio)triphosphate binding in rat brain. *J. Neurosci. Res.*, **61**, 674-685.
- Akam, E.C., Challiss, R.A. & Nahorski, S.R. (2001) G<sub>(q/11)</sub> and G<sub>(i/o)</sub> activation profiles in CHO cells expressing human muscarinic acetylcholine receptors: dependence on agonist as well as receptor-subtype. *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 950-958.
- Andre, V., Pineau, N., Motte, J.E., Marescaux, C. & Nehlig, A. (1998) Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 2094-2106.
- Araujo, D.M., Lapchak, P.A., Regenold, W. & Quirion, R. (1989) Characterization of [<sup>3</sup>H]AF-DX 116 binding sites in the rat brain: evidence for heterogeneity of muscarinic-M2 receptor sites. *Synapse*, **4**, 106-114.
- Aubert, I., Cécyre, D., Gauthier, S. & Quirion, R. (1996) Comparative ontogenetic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **369**, 31-55.
- Ben-Barak, J. & Dudai, Y. (1979) Cholinergic binding sites in rat hippocampal formation: properties and ontogenesis. *Brain Res.*, **166**, 245-257.
- Bernes, S.M. & Kaplan, A.M. (1994) Evolution of neonatal seizures. *Pediatr. Clin. North Am.*, **41**, 1069-1104.
- Birdsall, N.J., Burgen, A.S. & Hulme, E.C. (1978) The binding of agonists to brain muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.*, **14**, 723-736.
- Bonner, T.I., Buckley, N.J., Young, A.C. & Brann, M.R. (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science*, **237**, 527-532.

- Bradford, H.F. (1995) Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog. Neurobiol.*, **47**, 477-511.
- Brann, M.R., Buckley, N.J. & Bonner, T.I. (1988) The striatum and cerebral cortex express different muscarinic receptor mRNAs. *FEBS Lett.*, **230**, 90-94.
- Brown, D.A., Abogadie, F.C., Allen, T.G., Buckley, N.J., Caulfield, M.P., Delmas, P., Haley, J.E., Lamas, J.A. & Selyanko, A.A. (1997) Muscarinic mechanisms in nerve cells. *Life Sci.*, **60**, 1137-1144.
- Buckley, N.J., Bonner, T.I. & Brann, M.R. (1988) Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J. Neurosci.*, **8**, 4646-4652.
- Caulfield, M.P. (1993) Muscarinic receptors - characterization, coupling and function. *Pharmacol. Ther.*, **58**, 319-379.
- Cole, A.J., Koh, S. & Zheng, Y. (2002) Are seizures harmful: what can we learn from animal models? *Prog. Brain Res.*, **135**, 13-23.
- Cortes, R. & Palacios, J.M. (1986) Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the rat brain. I. Quantitative autoradiographic studies. *Brain Res.*, **362**, 227-238.
- Cox, C.L., Metherate, R. & Ashe, J.H. (1994) Modulation of cellular excitability in neocortex: muscarinic receptor and second messenger-mediated actions of acetylcholine. *Synapse*, **16**, 123-136.
- Danik, M., Chabot, J.G., Hassan-Gonzalez, D., Suh, M. & Quirion, R. (1993) Localization of sulfated glycoprotein-2/clusterin mRNA in the rat brain by in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.*, **334**, 209-227.
- Dallanoce, C., Conti, P., De Amici, M., De Micheli, C., Barocelli, E., Chiavarini, M., Ballabeni, V., Bertoni, S. & Impicciatore, M. (1999) Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 1539-1547.
- De Deyn, P.P. & Macdonald, R.L. (1989) Effects of antiepileptic drugs on GABA responses and on reduction of GABA responses by PTZ and DMCM on mouse neurons in cell culture. *Epilepsia*, **30**, 17-25.

- Dicker, F., Quitterer, U., Winstel, R., Honold, K. & Lohse, M.J. (1999) Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **96**, 5476-5481.
- Dohanich, G.P., Witcher, J.A., Weaver, D.R. & Clemens, L.G. (1982) Alteration of muscarinic binding in specific brain areas following estrogen treatment. *Brain Res.*, **241**, 347-350.
- Dorje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E. & Brann, M.R. (1991) Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**, 727-733.
- Dupuis, D.S., Palmier, C., Colpaert, F.C. & Pauwels, P.J. (1998) Autoradiography of serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor-activated G proteins in guinea pig brain sections by agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS binding. *J. Neurochem.*, **70**, 1258-1268.
- El-Bakri, N.K., Adem, A., Suliman, I.A., Mulugeta, E., Karlsson, E., Lindgren, J.U., Winblad, B. & Islam, A. (2002) Estrogen and progesterone treatment: effects on muscarinic M<sub>4</sub> receptor subtype in the rat brain. *Brain Res.*, **948**, 131-137.
- Eloqayli, H., Dahl, C.B., Gotestam, K.G., Unsgard, G., Hadidi, H. & Sonnewald, U. (2003) Pentylentetrazole decreases metabolic glutamate turnover in rat brain. *J. Neurochem.*, **85**, 1200-1207.
- Felder, C.C., Bymaster, F.P., Ward, J. & DeLapp, N. (2000) Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J. Med. Chem.*, **43**, 4333-4353.
- Gattu, M., Pauly, J.R., Urbanawiz, S. & Buccafusco, J.J. (1997) Autoradiographic comparison of muscarinic M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> binding sites in the CNS of spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Brain Res.*, **771**, 173-183.
- Guo, Z.D., Suga, H., Okamura, M., Takeda, S. & Haga, T. (2001) Receptor-G<sub>α</sub> fusion proteins as a tool for ligand screening. *Life Sci.*, **68**, 2319-2327.

- Harrison, C. & Traynor, J.R. (2003) The [<sup>35</sup>S]GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci.*, **74**, 489-508.
- Hauser, W.A., Annegers, J.F. & Kurland, L.T. (1993) Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia*, **34**, 453-468.
- Hoglund, A.U. & Baghdoyan, H.A. (1997) M2, M3 and M4, but not M1, muscarinic receptor subtypes are present in rat spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **281**, 470-477.
- Hosey, M.M., DebBurman, S.K., Pals-Rylaarsdam, R., Richardson, R.M. & Benovic, J.L. (1996) The role of G-protein coupled receptor kinases in the regulation of muscarinic cholinergic receptors. *Prog. Brain Res.*, **109**, 169-179.
- Huang, R.Q., Bell-Horner, C.L., Dibas, M.I., Covey, D.F., Drewe, J.A. & Dillon, G.H. (2001) Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) receptors: mechanism and site of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 986-995.
- Kokka, N., Sapp, D.W., Witte, U. & Olsen, R.W. (1992) Sex differences in sensitivity to pentylentetrazol but not in GABA<sub>A</sub> receptor binding. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **43**, 441-447.
- Kubova, H. & Moshe, S. (1994) Experimental models of epilepsy in young animals. *J. Child Neurol.*, **9**, S3-11
- Laitinen, J.T. (1999) Selective detection of adenosine A1 receptor-dependent G-protein activity in basal and stimulated conditions of rat brain [<sup>35</sup>S]guanosine 5'-(gamma-thio)triphosphate autoradiography. *Neuroscience*, **90**, 1265-1279.
- Lason, W. & Przewlocki, R. (1994) Seizure-induced expression of G proteins in the rat hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **24**, 65-69.
- Levey, A.I., Kitt, C.A., Simonds, W.F., Price, D.L. & Brann, M.R. (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.*, **11**, 3218-3226.



- Levey, A.I. (1993) Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci.*, **52**, 441-448.
- Loscher, W., Honack, D., Fassbender, C. & Nolting, B. (1991) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III Pentylentetrazole seizure models. *Epilepsy Res.*, **8**, 171-189
- Mash, D.C. & Potter, L.T. (1986) Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neuroscience*, **19**, 551-564.
- Medina AE, M.A., Schmidt SL. (2001) Sex differences in sensitivity to seizures elicited by pentylentetrazol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **68**, 591-596.
- Meilleur, S., Aznavour, N., Descarries, L., Carmant, L, Mamer, OA, Psarropoulou, C. (2003) Pentylentetrazol-induced seizures in immature rats provoke long-term changes in adult hippocampal cholinergic excitability. *Epilepsia*, **44**, 507-517.
- Meilleur, S., Carmant, L. & Psarropoulou, C. (2000) Immature rat convulsions and long-term effects on hippocampal cholinergic neurotransmission. *NeuroReport*, **11**, 521-524.
- Mermelstein, P.G., Becker, J.B. & Surmeier, D.J. (1996) Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J. Neurosci.*, **16**, 595-604.
- Messer, W.S., Jr., Ellerbrock, B., Price, M. & Hoss, W. (1989) Autoradiographic analyses of agonist binding to muscarinic receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 837-850.
- Michel, M.C., Lewejohann, K., Farke, W., Bischoff, A., Feth, F. & Rascher, W. (1995) Regulation of NPY/NPY Y1 receptor/G protein system in rat brain cortex. *Am. J. Physiol.*, **268**, R192-200.
- Miller, J.W., McKeon, A.C. & Ferrendelli, J.A. (1987) Functional anatomy of pentylentetrazol and electroshock seizures in the rat brainstem. *Ann. Neurol.*, **22**, 615-621.

- Mizrahi, E.M. & Clancy, R.R. (2000) Neonatal seizures: early-onset seizure syndromes and their consequences for development. *Ment. Retard Dev. Disabil. Res. Rev.*, **6**, 229-241.
- Moreira, K.M., Hipolide, D.C., Nobrega, J.N., Bueno, O.F., Tufik, S. & Oliveira, M.G. (2003) Deficits in avoidance responding after paradoxical sleep deprivation are not associated with altered [<sup>3</sup>H]pirenzepine binding to M1 muscarinic receptors in rat brain. *Brain Res.*, **977**, 31-37.
- Narang, N. (1995) In situ determination of M1 and M2 muscarinic receptor binding sites and mRNAs in young and old rat brains. *Mech. Ageing Dev.*, **78**, 221-239.
- Olsen, K.L., Edwards, E., Schechter, N. & Whalen, R.E. (1988) Muscarinic receptors in preoptic area and hypothalamus: effects of cyclicity, sex and estrogen treatment. *Brain Res.*, **448**, 223-229.
- Palacios, J.M., Mengod, G., Vilaro, M.T., Wiederhold, K.H., Boddeke, H., Alvarez, F.J., Chinaglia, G. & Probst, A. (1990) Cholinergic receptors in the rat and human brain: microscopic visualization. *Prog. Brain Res.*, **84**, 243-253.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press, Sydney.
- Planas, AM, Soriano, MA., Ferrer I, Rodriguez Farre E. (1994). Regional expression of inducible heat shock protein-70 mRNA in the rat brain following administration of convulsant drugs. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **27**, 127-137.
- Pohl, M. & Mares, P. (1987) Effects of flunarizine on Metrazol-induced seizures in developing rats. *Epilepsy Res.*, **1**, 302-305.
- Potier, S. & Psarropoulou, C. (2004) Modulation of muscarinic facilitation of epileptiform discharges in immature rat neocortex. *Brain Res.*, **997**, 194-206.
- Ramanjaneyulu, R. & Ticku, M.K. (1984) Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Eur. J. Pharmacol.*, **98**, 337-345.

- Santos, N.F., Marques, R.H., Correia, L., Sinigaglia-Coimbra, R., Calderazzo Sanabria, E.R., & Cavalheiro, E.A. (2000) Multiple pilocarpine-induced status epilepticus in developing rat: a long-term behavioral and electrophysiological study. *Epilepsia*, **41**, S57-63.
- Schroder, H., Becker, A. & Lossner, B. (1993) Glutamate binding to brain membranes is increased in pentylentetrazole-kindled rats. *J. Neurochem.*, **60**, 1007-1011.
- Seeger, T. & Alzheimer, C. (2001) Muscarinic activation of inwardly rectifying K(+) conductance reduces EPSPs in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Physiol.*, **535**, 383-396.
- Serra, M., Dazzi, L., Pisu, M.G., Cagetti, E. & Biggio, G. (1997) Reversal of a selective decrease in hippocampal acetylcholine release, but not of the persistence of kindling, after discontinuation of long-term pentylentetrazol administration in rats. *Brain Res.*, **751**, 175-179.
- Sharif, N.A., Williams, G.W. & DeSantis, L.M. (1995) Affinities of muscarinic drugs for [<sup>3</sup>H]N-methylscopolamine (NMS) and [<sup>3</sup>H]oxotremorine (OXO) binding to a mixture of M1-M4 muscarinic receptors: use of NMS/OXO-M ratios to group compounds into potential agonist, partial agonist, and antagonist classes. *Neurochem. Res.*, **20**, 669-674.
- Shehab, S., Coffey, P., Dean, P. & Redgrave, P. (1992) Regional expression of fos-like immunoreactivity following seizures induced by pentylentetrazole and maximal electroshock. *Exp. Neurol.*, **118**, 261-274.
- Sim, L.J. & Childers, S.R. (1997) Anatomical distribution of mu, delta, and kappa opioid- and nociceptin/orphanin FQ-stimulated [<sup>35</sup>S]guanylyl-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in guinea pig brain. *J. Comp. Neurol.*, **386**, 562-572.
- Spencer, D.G. Jr., Horvath, E. & Traber, J. (1986) Direct autoradiographic determination of M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor distribution in the rat brain: relation to cholinergic nuclei and projections. *Brain Res.*, **380**, 59-68.

- Squires, R.F., Saederup, E., Crawley, J.N., Skolnick, P & Paul, S.M. (1984) Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain, *Life Sci.*, **35**, 1439-1444
- Swann, J.W. & Hablitz, J.J. (2000) Cellular abnormalities and synaptic plasticity in seizure disorders of the immature nervous system. *Ment. Retard Dev. Disabil. Res. Rev.*, **6**, 258-267.
- Szyndler, J., Rok, P., Maciejak, P., Walkowiak, J., Czlonkowska, A.I., Sienkiewicz-Jarosz, H., Wisłowska, A., Zienowicz, M., Lehner, M., Bidzinski, A., Kostowski, W. & Plaznik, A. (2002) Effects of pentylenetetrazol-induced kindling of seizures on rat emotional behavior and brain monoaminergic systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **73**, 851-861.
- Tayebati, S.K., Amenta, F., El-Assouad, D. & Zaccheo, D. (2002) Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the hippocampus of aged rats. *Mech. Ageing. Dev.*, **123**, 521-528.
- Turski, W.A., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z. & Turski, L. (1983) Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia*, **39**, 1408-1411.
- Van Koppen, C.J. & Kaiser, B. (2003) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol. Ther.*, **98**, 197-220.
- Velisek, L., Kubova, H., Pohl, M., Stankova, L., Mares, P. & Schickerova, R. (1992) Pentylenetetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **346**, 588-591.
- Vilaro, M.T., Palacios, J.M. & Mengod, G. (1990) Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neurosci. Lett.*, **114**, 154-159.
- Volpe, J.J. (1989) Neonatal seizures: current concepts and revised classification. *Pediatrics*, **84**, 422-428.

- Volpicelli, L.A. & Levey, A.I. (2004) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res*, **145**, 59-66.
- Walsh LA, L.M., Zhao TJ, Chiu TH, Rosenberg HC. (1999) Acute pentylentetrazol injection reduces rat GABA<sub>A</sub> receptor mRNA levels and GABA stimulation of benzodiazepine binding with no effect on benzodiazepine binding site density. *J Pharmacol Exp Ther*, **289**, 1626-1633.
- Woodbury L.A. (1977) Incidence and prevalence of seizure disorders including the epilepsies in the USA. A review and analysis of the literature *Plan for the nationwide action on epilepsy*. DHEW publication, pp. 24-77.
- Yoshida, T., Kuwabara, Y., Sasaki, M., Fukumura, T., Ichimiya, A., Takita, M., Ogomori, K., Ichiya, Y. & Masuda, K. (2000) Sex-related differences in the muscarinic acetylcholinergic receptor in the healthy human brain - a positron emission tomography study. *Ann Nucl Med*, **14**, 97-101.
- Yount, G.L., Ponsalle, P. & White, J.D. (1994) Pentylentetrazole-induced seizures stimulate transcription of early and late response genes. *Brain Res Mol Brain Res*, **21**, 219-224.
- Zecevic, N., Mojsilovic, J., Novakovic, B. & Rakic, L. (1989) Brain plasticity after corpus callosum transection in the newborn rat. *Metab Brain Dis*, **4**, 25-31.
- Zhang, X., Tian, J.Y., Svensson, A.L., Gong, Z.H., Meyerson, B. & Nordberg, A. (2002) Chronic treatments with tacrine and (-)-nicotine induce different changes of nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors in the brain of aged rat. *J Neural Transm*, **109**, 377-392.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Color-coded autoradiographs illustrating the basal and agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS incorporation in the cerebral cortex and hippocampus of control (A,C,E,G) and PTZ-treated rats (B,D,F,H), at a transverse level near stereotaxic plane A 4.7 mm according to Paxinos and Watson (1986). The enlarged area includes the Par1 (primary somatosensory) region of cerebral cortex and dorsal hippocampus. ACh, acetylcholine; Beth, bethanechol; Oxo, oxotremorine. There are noticeable increases in [<sup>35</sup>S]GTPγS incorporation in both the cerebral cortex and hippocampus of PTZ-treated compared to control rats after stimulation by ACh and Oxo. For quantified data, see Table 3.

**Figure 2.** Graph illustrating the basal and oxotremorine-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS incorporation in the cerebral cortex and hippocampus of female versus male control and PTZ-treated rats. Means ± SEM in femtomoles/mg of protein from the number of rats indicated in brackets. Note the slightly higher levels of basal incorporation in the parietal and cingulate cortex of females versus males in both control and treated rats. As indicated by asterisks, this gender difference reaches statistical significance (two-tailed Student's t test) in the cingulate cortex of controls and the parietal cortex of PTZ rats, respectively. \*  $p < 0.05$ .

| Regions | M1<br>[ <sup>3</sup> H]pirenzepine |            | M2<br>[ <sup>3</sup> H]AFDX-384 |           |
|---------|------------------------------------|------------|---------------------------------|-----------|
|         | Control                            | PTZ        | Control                         | PTZ       |
| Cg      | 342.5±32.1                         | 371.8±24.8 | 164.1±6.5                       | 167.5±8.7 |
| Par 1   | 636.2±18.8                         | 667.9±24.6 | 238.2±8.2                       | 234.8±7.8 |
| CA1     | 869.1±51.0                         | 958.1±68.6 | 200.8±6.1                       | 206.0±9.3 |
| CA3     | 469.9±21.1                         | 528.1±21.1 | 114.1±5.0                       | 115.8±5.4 |

**Table 1.** Autoradiographic measurement of [<sup>3</sup>H]pirenzepine and [<sup>3</sup>H]AFDX-384 binding in the neocortex and hippocampus (CA1, CA3) of control (n=8) and PTZ-treated rats (n=12). Means ± SEM in femtomoles/mg of protein. Statistical comparisons between control and PTZ rats were above the p = 0.05 significance level. In this and following tables: Cg, cingulate cortex; Par 1, parietal cortex.

| Regions | m1           |             | m2         |            | m3         |            |
|---------|--------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
|         | Control      | PTZ         | Control    | PTZ        | Control    | PTZ        |
| Cg      | 369.3±47.5   | 367.7±36.6  | 308.3±35.0 | 352.0±36.2 | 106.8±8.2  | 95.5±9.8   |
| Par 1   | 536.9±64.1   | 517.1±46.9  | 215.8±21.8 | 231.7±17.6 | 152.4±8.0  | 182.3±13.8 |
| Pyr     | 3157.0±136.8 | 3034.0±93.1 | 501.4±54.0 | 477.9±55.4 | 862.6±56.9 | 957.6±64.1 |
| Gr      | 3230.0±142.5 | 3188.0±65.5 | 341.3±65.6 | 366.8±55.3 | 124.8±27.8 | 147.7±26.4 |

**Table 2.** *In situ* hybridization measurement of m1, m2 and m3 receptor mRNA in the neocortex (Cg, Par 1) and hippocampus (Pyr, Gr) of control (n=6) and PTZ-treated rats (n=9). Means ± SEM in nCi/mg of protein. Statistical comparisons between control and PTZ rats were above the p=0.05 significance level. Pyr, pyramidal layer of hippocampus (CA1-CA3); Gr, granular layer of dentate gyrus.



| Regions | Acetylcholine      |                 | Bethanechol        |                 | Oxotremorine       |                 |
|---------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
|         | Control<br>(n = 6) | PTZ<br>(n = 10) | Control<br>(n = 6) | PTZ<br>(n = 10) | Control<br>(n = 8) | PTZ<br>(n = 12) |
| Cg      | 37.4±4.7           | 57.7±8.6        | 44.8±7.3           | 57.1±10.3       | 50.8±8.0           | 87.6±13.0 *     |
| Par 1   | 38.8±5.1           | 62.9±8.9 *      | 32.2±3.3           | 55.3±10.2       | 39.0±7.4           | 79.1±10.2 **    |
| CA1     | 20.1±2.8           | 37.9±5.8 *      | 26.1±9.3           | 36.2±6.4        | 22.9±3.9           | 46.4±5.2 **     |
| CA3     | 19.8±2.5           | 35.3±6.7        | 23.5±6.2           | 37.6±9.7        | 26.4±5.6           | 54.8 ±7.4 **    |

**Table 3.** Agonist-stimulated [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S incorporation in the neocortex (Cg, Par 1) and hippocampus (CA1, CA3) of control and PTZ-treated rats. Percent increases over basal, as initially measured in femtomoles/mg of protein. Means  $\pm$  SEM from the number of rats indicated in brackets. Statistically significant differences from control are denoted by asterisks. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01.

**Oxotremorine in  
presence of atropine**

| <b>Region</b> | <b>Control</b> | <b>PTZ</b> |
|---------------|----------------|------------|
| Cg            | 11.8 ± 5.5     | 8.3 ± 2.0  |
| Par1          | 18.6 ± 7.1     | 7.1 ± 2.2  |
| CA1           | 16.4 ± 10.8    | 17.4 ± 6.0 |
| CA3           | 34.8 ± 7.8     | 24.2 ± 7.3 |

**Table 4.** Blockade by atropine of the oxotremorine stimulation of [<sup>35</sup>S]GTPγS incorporation in the neocortex (Cg and Par1) and hippocampus (CA1 and CA3) of control (n=6) and PTZ-treated (n=8) rats. Means ± SEM of percent increases over basal, as initially measured in femtomoles/mg of protein. Note the much lower activations than in Table 3.

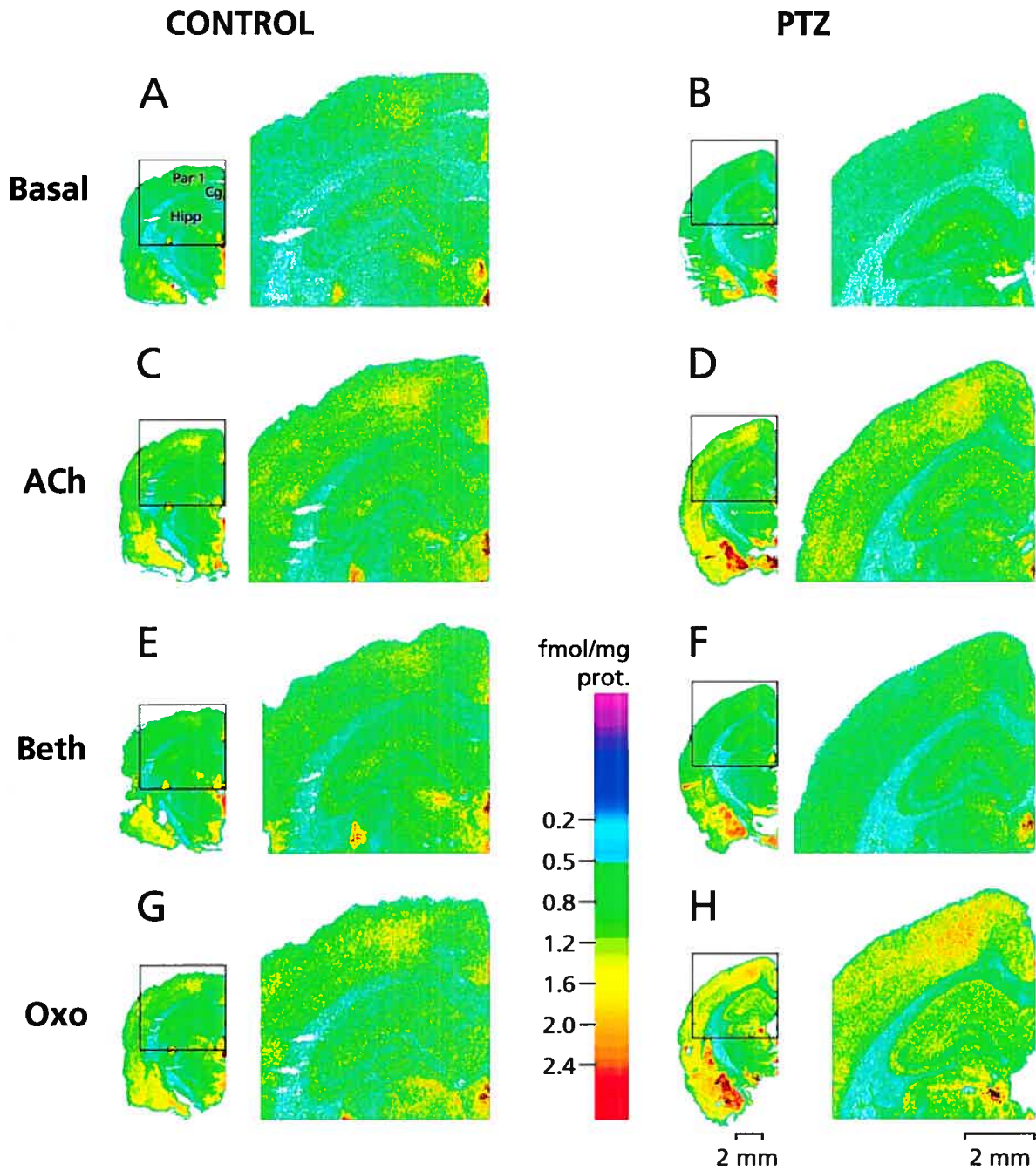


Figure 1

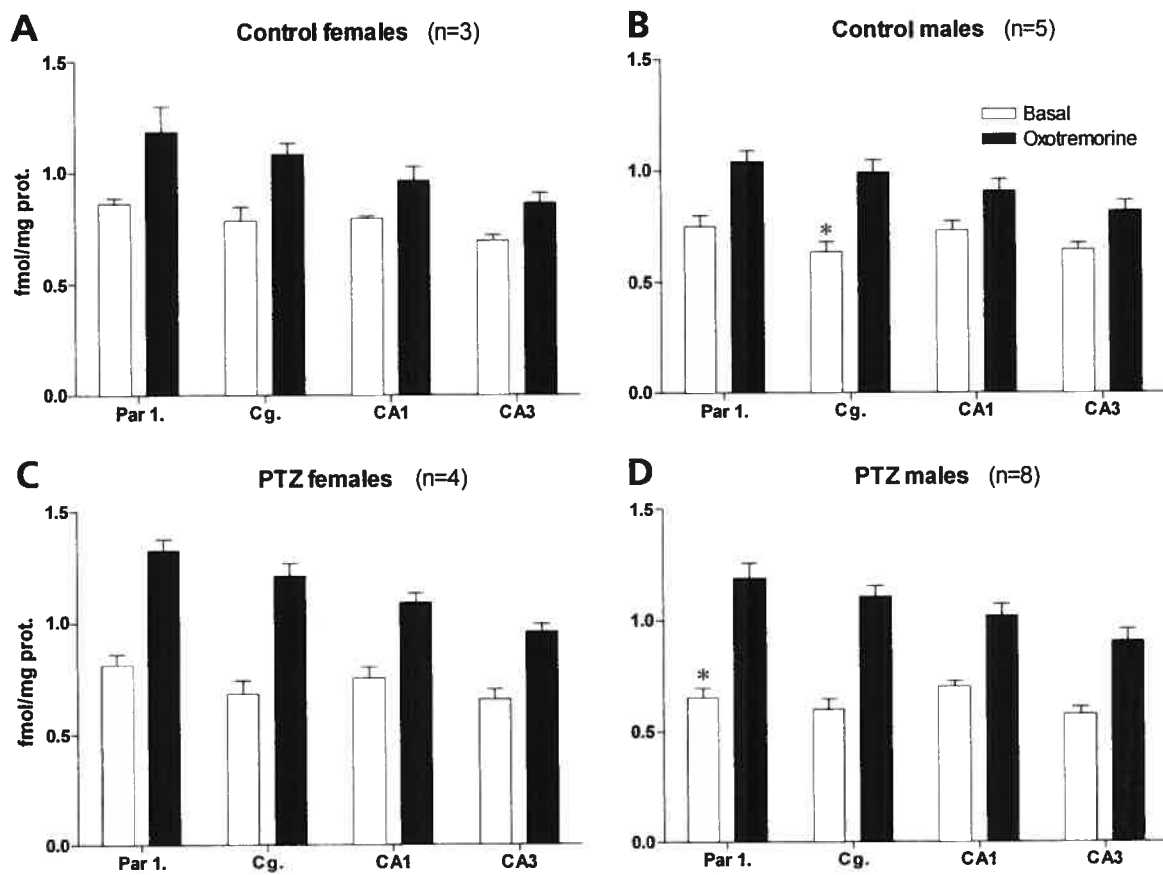
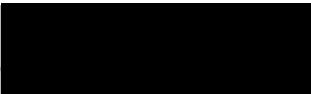
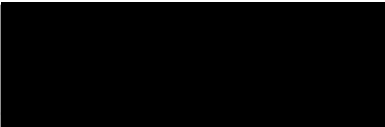




Figure 2

À titre de coauteur de l'article "A pentylenetetrazole-induced generalized seizure in early life enhances the efficacy of muscarinic receptors to G-protein in neocortex and hippocampus of adult rat." (Soizic Potier, Jacques Sénécal, Jean-Guy Chabot, Caterina Psarropoulou, and Laurent Descarries, article soumis en décembre 2004), je suis d'accord pour que Soizic Potier inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Modulation cholinergique de l'activité épileptiforme dans le cortex, et conséquences à long terme de crises précoces expérimentales dans le cortex et l'hippocampe de rat"

|                                    |  |                            |
|------------------------------------|--|----------------------------|
| <u>C. PSARROPOULOU</u><br>Coauteur |                 | <u>24 Nov 2004</u><br>Date |
| <u>L. DESCARRIES</u><br>Coauteur   | <br>Signature  | <u>13/12/04</u><br>Date    |
| <u>J. SENECAI</u><br>Coauteur      | <br>Signature | <u>15/12/04</u><br>Date    |
| <u>J.-G. CHABOT</u><br>Coauteur    | <br>Signature | <u>20/12/04</u><br>Date    |

## Chapitre V

# DISCUSSION GÉNÉRALE

## V.1 LES TECHNIQUES ET MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

### V.1.1 ENREGISTREMENTS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES

Les techniques de production et d'utilisation de tranches néocorticales de rat ont été adaptées à partir de celles précédemment utilisées dans notre laboratoire sur des tranches hippocampales (Gruslin *et al.*, 1999; Psarropoulou & Descombes, 1999; Meilleur *et al.*, 2000).

Dans ces tranches néocorticales, en conditions de désinhibition, nous avons enregistré des décharges épileptiformes spontanées, dont le taux de survenue diminue avec le développement de l'animal, jusqu'à être quasi absentes chez l'adulte. La majeure partie de notre étude de la modulation cholinergique dans le néocortex de rat a été réalisée chez des animaux âgés de P10 à P20, la sensibilité aux stimuli excitateurs épileptogènes étant accrue durant cette période (Moshe *et al.*, 1983) et l'innervation cholinergique atteignant des niveaux adultes dès P14 (Mechawar & Descarries, 2001).

De la même manière, les potentiels de champs enregistrés dans les tranches de néocortex de rat immature présentent un profil très différent selon la sous-couche corticale d'enregistrement (Chapitre III, Figure 1A) ; nous avons finalement opté pour les couches néocorticales profondes (IV-V), qui présentent des décharges d'amplitude plus conséquente .

Tout au long de notre étude électrophysiologique de la modulation cholinergique de l'activité épileptiforme, nous avons distingué l'activité de forme interictale (semblable à celle enregistrée extracellulairement entre les crises), de la forme ictale qui est enregistrée extracellulairement durant les crises (cf. Figure 4 chapitre I). Tel que détaillé plus haut (section I.3.2), les décharges ictales se présentent sous la forme de

bouffées de décharges de très haute fréquence. De ce fait, afin d'évaluer l'effet de la modulation cholinergique sur ces deux types d'activité, nous avons mesuré la fréquence de ces décharges, leur taux de survenue (i.e le nombre de bouffées de décharges ictales par seconde), ainsi que la durée des décharges ictales.

Les antagonistes muscariniques sélectifs pour les sous-types M1, M2, M3 et M4, respectivement pirenzepine, AFDX116, 4 DAMP, tropicamide / gallamine, ont été ajoutés au milieu de perfusion à une faible concentration (1  $\mu$ M), de façon à limiter les effets de leur sélectivité relative. Ainsi, la pirenzepine présente une forte affinité pour M1, mais également une affinité modérée pour M3 et faible envers M2 (Dorje *et al.*, 1991); l'AFDX116 se caractérise par une forte affinité envers M2 et une plus modérée envers M1 et M3 (Dorje *et al.*, 1991); le 4 DAMP se lie à forte affinité sur M1 et une légèrement plus faiblement sur M2; la tropicamide (Lazareno & Birdsall, 1993; Lazartigues *et al.*, 1999) et la gallamine (Gnagey *et al.*, 1999) présentent chacun une sélectivité modeste pour les M4, d'où l'utilisation de deux antagonistes. Leur utilisation à faible concentration, ainsi que la connaissance des mécanismes de cascades intracellulaires engendrés par chacun des sous types de mAChR a cependant permis de dresser un profil du sous-type de mAChR impliqué dans la modulation de l'activité épileptiforme dans le néocortex de rat immature.



## V.1.2 LE CHOIX DU MODÈLE DE CRISES EXPÉRIMENTALES INDUITES PAR LE PENTYLENETETRAZOLE

Après avoir étudié les mécanismes de modulation cholinergique de l'activité épileptiforme dans le néocortex du rat immature, nous nous sommes intéressés aux conséquences à long terme des crises précoces expérimentales dans le cortex et l'hippocampe du rat adulte.

Le choix du PTZ en tant qu'agent convulsif repose sur l'ensemble des caractéristiques détaillées précédemment (section I.4.1). Par ailleurs, dans le cadre de notre étude des conséquences à long terme d'une crise PTZ précoce sur le système cholinergique dans l'hippocampe et le néocortex adultes, le choix de ce modèle s'est imposé de lui-même afin de poursuivre les travaux préalablement réalisés dans notre laboratoire (Meilleur *et al.*, 2000; Meilleur *et al.*, 2003). Ces études avaient mis en évidence l'apparition de décharges de type interictal dans l'aire CA3 de tranches hippocampales de rats adultes ayant subi une crise PTZ à P20, lors de leur exposition à l'eserine (un agent anticholinestérasique qui augmente la concentration d'ACh endogène dans le milieu extracellulaire). Cette hyperexcitabilité cholinergique à long terme observée chez les rats PTZ était absente chez les rats contrôles, et abolie par l'adjonction d'atropine, suggérant un mécanisme médié par les récepteurs muscariniques. Toutefois, les expériences d'immunocytochimie à la choline acetyltransferase (ChAT) n'ont relevé aucune modification de l'innervation cholinergique chez les rats PTZ, en terme de taille ou nombre de varicosités par unité de longueur d'axone marqué à la ChAT. De plus, les analyses de spectrométrie de

masse ont mesuré des niveaux équivalents de contenu hippocampal en GABA et ACh chez les rats contrôles et PTZ.

Dans l'étude présentée au chapitre IV, nous avons donc voulu comprendre les mécanismes impliqués dans cette hyperexcitabilité cholinergique développée à long terme par suite d'une crise PTZ précoce. Lors de cette étude, une dose de 70-80 mg/kg de PTZ a été injectée par voie intrapéritonéale (IP) de façon à augmenter le nombre d'animaux présentant des crises généralisées tout en maintenant un taux de mortalité minimal. Au cours de cette étude, nous avons accordé une attention particulière à d'éventuelles différences de susceptibilité entre les sexes.

Lors de l'induction des crises PTZ chez les rats P20, aucune différence de seuil de déclenchement et de sévérité des crises n'a été observée entre animaux mâles et femelles, contrairement à ce qui avait été préalablement rapporté (Kokka *et al.*, 1992; Medina *et al.*, 2001). Toutefois, même si Medina *et al.* (2001) avaient rapporté un seuil de susceptibilité aux crises PTZ significativement inférieur chez les femelles comparativement aux mâles, il faut souligner que l'étude de ces auteurs a été réalisée chez la souris où seules les doses intrapéritonéales de 50 et 60 mg/kg ont entraîné une différence de susceptibilité selon le sexe. Il faut aussi noter qu'à la dose utilisée dans le cadre de notre étude, 70 mg/kg, Medina *et al.* n'avaient relevé aucune différence de susceptibilité aux crises PTZ en fonction du sexe, alors que chez la souris, la  $CD_{50}$  du PTZ est de 50 mg/kg (Medina *et al.*, 2001) vs. 70 mg/kg chez le rat (Velisek *et al.*, 1992). Kokka *et al.* (1992) ont à l'inverse rapporté un seuil de susceptibilité aux crises PTZ significativement inférieur chez le rat mâle comparativement à la femelle, par

suite de l'administration de PTZ par voie intraveineuse (IV) à la dose de 10 mg/mL (Kokka *et al.*, 1992).

Nous avons attendu quarante jours après l'induction des crises pour effectuer les mesures des niveaux de liaison d'antagonistes M1 et M2, des niveaux d'expression des m1, m2 et m3, et du niveau de couplage des mAChR aux protéines G chez des rats contrôles et PTZ. Ce délai était celui qui correspondait à une hyperexcitabilité cholinergique maximale dans l'aire CA3, lors de l'étude précédemment réalisée par Meilleur *et al.* (2000). Ces auteurs avaient également observé, chez des rats ayant subi une crise PTZ plus de sept mois auparavant, la persistance des décharges spontanées interictales lors de l'inhibition de la cholinestérase (Meilleur *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent la permanence de ce phénomène tout au long de la vie de l'animal.

### **V.1.3 QUANTIFICATION AUTORADIOGRAPHIQUE DU NIVEAU DE LIAISON DES RÉCEPTEURS MUSCARINIQUES CORTICAUX ET HIPPOCAMPaux**

Afin d'évaluer une éventuelle variation du nombre de mAChRs ou de leur affinité entre rats contrôles et PTZ, nous avons mesuré dans ces deux groupes la liaison d'antagonistes M1 et M2 tritiés (respectivement, la [<sup>3</sup>H]pirenzepine et le [<sup>3</sup>H]AFDX 384) sur les mAChR dans le cortex et l'hippocampe. Tout comme lors des expériences électrophysiologiques, nous avons été confrontés au choix des antagonistes mAChR afin de limiter les conséquences du manque de sélectivité des antagonistes actuellement disponibles. La pirenzepine s'avère un puissant antagoniste M1 (Felder *et al.*, 2000), même si elle montre également une affinité modérée envers les sous-types M3 et M2

(Dorje *et al.*, 1991). L'AFDX 384 est pour sa part un puissant antagoniste M2 avec une affinité modérée envers M3 (Dorje *et al.*, 1991). Dans les deux cas, les expériences de radioliation ont été effectuées en présence de ligand froid, de manière à assurer la spécificité du marquage.

#### **V.1.4 QUANTIFICATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DES RÉCEPTEURS MUSCARINIQUES**

Lors des expériences d'hybridation *in situ*, les ribosondes m1-m4 ont pu être produites dans chaque orientation, à partir de plasmides contenant une région de 0.24-0.5kb de la troisième boucle cytoplasmique de l'ADNc de récepteurs muscariniques humains pour m1-m4 (Bonner *et al.*, 1987). Les mAChR présentent en effet des structures très similaires d'une espèce à une autre, et en particulier si l'on compare l'homme et le rat. (Venter, 1983) Pour une raison inconnue, seule la ribosonde antisens Hm2 a pu être synthétisée dans le cas de m2 (la sonde sens servant de contrôle, et permettant de mesurer l'hybridation non spécifique).

Dans le cas de m4, les ribosondes ayant, pour une raison inconnue, hybridé de façon non spécifique le niveau d'expression de ce récepteur n'a pu être quantifié. Cependant, selon des études d'immunoprécipitation, la densité de récepteurs m4 est 2 à 2.5 fois moins importante que celle des m1 et m2 dans le cortex cérébral, et la densité des m5 y est négligeable devant celles de ces deux sous types de mAChR (Levey *et al.*, 1991). Dans l'hippocampe en revanche, la densité de m4 atteint des niveaux très légèrement inférieurs à ceux de m1 et m2 (Levey *et al.*, 1995). Toutefois, compte tenu des effets inhibiteurs de M4 (cf. I.7.e), il paraît peu probable qu'une variation à long

terme du niveau d'expression de M4 soit à l'origine de l'hyperexcitabilité cholinergique observée à long terme suite à une crise PTZ précoce (Meilleur *et al.*, 2000; Meilleur *et al.*, 2003).

### **V.1.5 QUANTIFICATION DU NIVEAU DE L'EFFICACITÉ DE COUPLAGE DES RÉCEPTEURS MUSCARINIQUES AUX PROTÉINES G**

Les niveaux d'incorporation de  $GTP\gamma[^{35}S]$  induite par une stimulation cholinergique ont été mesurés dans le cortex et l'hippocampe des rats contrôle et PTZ après activation par l'ACh, le bethanechol (Bet) et l'oxotremorine (Oxo). Le Bet est un agoniste muscarinique partiel, mais contrairement à l'ACh, il présente une résistance à la cholinestérase (Sharif *et al.*, 1995). L'Oxo, pour sa part, est un puissant agoniste muscarinique, qui semble présenter une faible préférence envers les récepteurs M2 (Dallanocce *et al.*, 1999). Les doses des divers agonistes utilisés ont été déterminées au-delà de la dose de saturation sur des courbes doses-réponses.

Afin de s'assurer de la médiation de l'incorporation de  $GTP\gamma[^{35}S]$  par une stimulation muscarinique, certaines coupes ont été traitées séparément avec des antagonistes muscariniques préalablement à la stimulation par l'oxotremorine. L'atropine est un antagoniste muscarinique non sélectif qui a totalement bloqué l'incorporation de  $GTP\gamma[^{35}S]$ , tandis que la pirenzepine et l'AFDX 384, respectivement antagonistes des M1 et M2., ont réduit cette incorporation de 79 et 61% chacun, soit plus de 100% à eux deux. Ces mesures pointent de nouveau vers certaines lacunes quant à la sélectivité des antagonistes mAChR actuellement disponibles.

## **V.2 EFFET FACILITATEUR DE L'ACÉTYLCHOLINE SUR L'ÉPILEPTOGENÈSE DANS LE NÉOCORTEX DE RAT IMMATURE**

### **V.2.1 RAPPEL DES PRINCIPAUX RÉSULTATS**

Dans des tranches de cerveau immature (10 à 31 jours postnataux), exposés à la bicuculline methiodide, un antagoniste GABA<sub>A</sub>, nous avons enregistré, extracellulairement, des potentiels évoqués ainsi que des décharges synchrones spontanées dans les couches profondes de cortex cérébral. L'addition de l'anticholinestérasique eserine a diminué l'amplitude et la durée de ces potentiels d'action dans la plupart des tranches examinées (13/19 tranches, 68%), et a significativement augmenté la fréquence de survenue des décharges épileptiformes spontanées, ou encore permis la survenue de ces décharges dans 47% des tranches étudiées (9/19). Tous ces effets ayant été bloqués par l'adjonction l'atropine, un antagoniste des récepteurs muscariniques, ces résultats ont suggéré une médiation de ces effets par des récepteurs muscariniques activés par l'acétylcholine endogène. Tandis que l'effet cholinergique inhibiteur observé est un candidat improbable quant à la cessation des crises, l'effet excitateur pourrait quant à lui promouvoir ou aggraver leur survenue. En conclusion, ces résultats démontrent que l'acétylcholine endogène peut contribuer aux mécanismes épileptogènes dans le néocortex immature.

## V.2.2 IMPLICATIONS FONCTIONNELLES

Dans le néocortex de rat immature, l'ACh endogène présente deux effets paradoxaux. On y observe un effet inhibiteur sur les décharges épileptiformes, sous la forme d'une diminution de la durée et de l'amplitude de ces décharges évoquées par stimulation électrique en condition de désinhibition. Mais l'ACh endogène exerce également un effet excitateur en induisant ou en augmentant la fréquence des décharges épileptiformes spontanées de type interictal et/ou ictal en condition de désinhibition. Ces deux effets paradoxaux sont tous deux médiés via les récepteurs muscariniques. L'effet excitateur de l'ACh semble toutefois jouer un rôle prépondérant par rapport à l'inhibition cholinergique, d'autant que, dans ce dernier cas, les réponses évoquées inhibées par l'addition d'ésérine sont assimilées à des décharges de type interictal, tandis que l'effet excitateur peut clairement faciliter la génération et/ou la propagation des décharges épileptiformes de type interictal et/ou ictal, aggravant ou favorisant ainsi l'épileptogenèse dans le néocortex immature.

La relâche d'ACh endogène étant accrue dans un grand nombre de situations comportementales, telles la nouveauté ou la peur (Acquas *et al.*, 1996), une attention soutenue (Phillis & Chong, 1965), le stress (Moor *et al.*, 1998), les crises épileptiques (Gardner & Webster, 1977), les traitements chroniques d'oestradiol (Lapchak *et al.*, 1990) ou le sevrage d'alcool (Imperato *et al.*, 1998), l'effet excitateur de niveaux élevés d'ACh endogène dans le néocortex immature pourrait, dans ces circonstances, favoriser la survenue ou l'aggravation de crises épileptiques.

Par ailleurs, certaines données suggérant que l'ACh représente, de tous les neuromodulateurs, la plus dense des innervations corticales (Mechawar *et al.*, 2000;

Mechawar & Descarries, 2001), la facilitation cholinergique des mécanismes épileptogènes pourrait s'avérer d'une importance essentielle, en termes de promotion ou d'aggravation de la manifestation des crises épileptiques.

### **V.3 LA MODULATION DE LA FACILITATION MUSCARINIQUE DES DÉCHARGES ÉPILEPTIFORMES DANS LE NÉOCORTEX DE RAT IMMATURE**

#### **V.3.1 RAPPEL DES PRINCIPAUX RÉSULTATS**

Nous avons examiné plus avant les effets cholinergiques sur la génération de décharges épileptiformes dans des tranches du néocortex immature chez le rat âgé de 10 à 20 jours postnataux. Des potentiels de champs spontanés et évoqués ont été enregistrés dans les couches profondes du néocortex, lors du blocage du récepteur GABA<sub>A</sub> par la bicuculline methiodide (BMI). L'anticholinestérasique eserine ainsi que le carbamyl chloride (CCh), un analogue de l'acétylcholine, ont tous deux diminué l'amplitude et la durée des potentiels de champs évoqués, parallèlement à une augmentation significative de la fréquence des décharges spontanées. Ces effets ont été contrés par l'application d'atropine, un antagoniste des récepteurs muscariniques, et sont restés inaffectés par l'hexamethonium, un antagoniste des récepteurs nicotiniques. La pirenzepine, un antagoniste M1 sélectif quant au sous-type, a bloqué les décharges spontanées dans une majorité des tranches, tandis que les antagonistes muscariniques des récepteurs M2, M3 et M4, respectivement l'AFDX116, le 4-DAMP, et la gallamine/tropicamide, n'ont qu'atténué leur fréquence. Les décharges spontanées





désinhibition a entraîné des effets opposés sur l'activité épileptiforme évoquée vs. spontanée.

L'effet muscarinique inhibiteur sur les potentiels de champs évoqués pourrait être médié via les M2, dont l'effet d'inhibition sur la relâche de neurotransmetteurs a été abondamment documenté (Segal, 1989; Vidal & Changeux, 1993; Cox *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1997; Qian & Saggau, 1997; De Sevilla *et al.*, 2002).

La fréquence des décharges épileptiformes spontanées, induites par le CCh en condition de désinhibition, a été significativement diminuée par tous les antagonistes mAChR testés, mais seule la pirenzepine, un antagoniste M1, a permis l'abolition de ces décharges. En outre, le mécanisme muscarinique impliqué dans la modulation des potentiels synchrones spontanés semble faire intervenir une libération calcique depuis les stocks intracellulaires. Or l'activation des M1 et M3, en augmentant la synthèse d'IP3 (inositol tri-phosphate), conduit à la relâche de calcium depuis les stocks intracellulaires. Les M1 seraient donc principalement impliqués dans l'augmentation cholinergique du taux de survenue de l'activité épileptiforme spontanée, probablement par augmentation de l'excitabilité neuronale via le blocage des canaux  $K^+_M$ . L'effet muscarinique inhibiteur sur la transmission synaptique médié via M2 serait largement contrebalancé par l'effet excitateur via M1.

Les jonctions électriques semblent également jouer un rôle facilitateur dans les mécanismes de génération et propagation des crises dans le néocortex du rat immature. Le pic de densité des jonctions électriques étant atteint au cours du développement (Naus *et al.*, 1991; Carlen *et al.*, 2000), leur nombre diminuant ensuite pour atteindre

les valeurs adultes (Connors *et al.*, 1983; Rorig & Sutor, 1996; Sutor, 2002), leur rôle pourrait être prépondérant dans le néocortex de rat immature comparativement à l'adulte.

Afin de connaître plus avant les propriétés intrinsèques, et notamment membranaires, des neurones neocorticaux immatures de rat, ainsi que la nature de la modulation cholinergique de l'activité épileptiforme qui y est observée, il sera nécessaire de poursuivre les analyses dans les mêmes conditions, mais en effectuant des enregistrements intracellulaires

L'effet muscarinique excitateur étant associé à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, un phénomène conduisant généralement à des dommages neuronaux (Holmes, 2002), l'activation des mAChR pourrait de cette façon, lors de phénomènes épileptiques précoces, altérer à long terme la physiologie cérébrale adulte.

## V.4 L'INDUCTION PRÉCOCE D'UNE CRISE GÉNÉRALISÉE PAR LE PENTYLENETETRAZOLE AUGMENTE À LONG TERME L'EFFICACITÉ DU COUPLAGE DES RÉCEPTEURS MUSCARINIQUES AUX PROTÉINES G

### V.4.1 RAPPEL DES PRINCIPAUX RÉSULTATS

Des travaux antérieurs du laboratoire avaient démontré que l'application de l'anticholinestérasique eserine entraîne l'apparition de décharges de type interictal dans l'aire CA3 de tranches d'hippocampe de rats adultes chez lesquels une crise généralisée a été induite par le pentylenetetrazole (PTZ) au cours du développement (à 20 jours postnataux, P20) (Meilleur *et al.*, 2000). Tel que mentionné précédemment, cette réponse excessive à l'acétylcholine n'était cependant associée à aucune modification du contenu hippocampal en ACh ou en GABA, ni de l'inhibition GABAergique ou de la densité de l'innervation cholinergique, et pourtant bloquée par l'application d'atropine, un antagoniste des récepteurs muscariniques (Meilleur *et al.*, 2003). Nous nous sommes donc tournés vers l'autoradiographie quantitative par liaison de radioligand, l'hybridation *in situ*, et la méthode de radioliasion de GTP $\gamma$ [<sup>35</sup>S], de manière à évaluer les propriétés des récepteurs muscariniques hippocampaux et néocorticaux chez des rats adultes ayant subi une crise PTZ à P20. Les densités de sites de liaison des récepteurs M1 et M2, respectivement marqués avec [<sup>3</sup>H]pirenzepine et [<sup>3</sup>H]AFDX-384, tout comme la quantité d'ARNm pour les récepteurs m1, m2 et m3 chez ces rats n'ont pas montré de différence significative par comparaison à des animaux témoins, ni dans l'hippocampe, ni dans le néocortex. En revanche, chez les rats PTZ, ces deux régions



immature (chapitre III), ceci laisse supposer que, par suite d'une crise précoce, l'augmentation de l'efficacité de leur couplage aux protéines G pourrait contribuer à la survenue de crises ultérieures.

Cette efficacité de couplage accrue des mAChR, observée à long terme chez les rats PTZ, laisse planer diverses hypothèses quant aux mécanismes cellulaires impliqués. La phosphorylation des mAChR, un mécanisme de désensibilisation des mAChR par découplage des protéines G (Dicker *et al.*, 1999) faisant intervenir une machinerie enzymatique complexe (cf. section I.7.g), pourrait être inhibée par une crise PTZ précoce, et augmenter ainsi l'efficacité de couplage des mAChR. On peut également envisager que le niveau d'oligomérisation des mAChR soit modifié par une crise PTZ, même si les conséquences fonctionnelles d'une telle formation d'oligomères mAChR demeurent inconnues (van Koppen & Kaiser, 2003).

Un beau défi pour l'avenir sera de percer à jour le mystère de l'augmentation à long terme du couplage des mAChR par suite d'une crise généralisée précoce, induite par le PTZ ou autrement. L'évaluation des niveaux de phosphorylation des mAChR, l'étude de leur degré d'oligomérisation, et éventuellement de leur distribution subcellulaire, devrait permettre de répondre à ces questions demeurées en suspens.

En outre, ces expériences ont permis de relever une différence entre rats mâles et femelles quant à l'activation basale du couplage aux protéines G (c'est-à-dire l'activation en l'absence de tout agoniste), qui s'avère supérieur dans l'hippocampe et le néocortex des rats femelles. Bien que l'explication de cette différence reste à venir, il sera important de la prendre en compte dans toute études effectuée chez l'une ou l'autre espèce à l'aide de la méthode du [<sup>35</sup>S]GTPγS. D'autre part, il serait également

important de se pencher sur une telle différence sexuelle fonctionnelle, et d'évaluer dans quelle mesure elle pourrait se traduire par une baisse du seuil d'activation des récepteurs métabotropiques chez les femelles, selon la période de leur cycle menstruel, comparativement aux mâles. A savoir si une telle différence pourrait éventuellement contribuer à la susceptibilité plus grande des femelles que des mâles, la question reste actuellement en suspens.

## V.5 EN GUISE DE CONCLUSION

La découverte d'une facilitation muscarinique des décharges épileptiformes dans le néocortex immature, ainsi que l'augmentation à long terme de l'efficacité de couplage des mAChR aux protéines G observée dans le cortex et l'hippocampe de rats ayant subi une crise généralisée précoce, laissent présager que ce changement pathophysiologique puisse faciliter la survenue de crises ultérieures.

Compte-tenu de l'hyperexcitabilité cholinergique décrite par Meilleur *et al.* (2003) dans l'hippocampe de rats ayant subi une crise de même type jusqu'à sept mois plus tard, l'augmentation de l'efficacité de couplage des mAChR aux protéines G induite par la survenue d'une crise généralisée précoce paraît être une modification pathophysiologique permanente.

L'augmentation de l'efficacité de couplage des mAChR à la suite d'une crise PTZ précoce pourraient représenter un mécanisme mis en jeu dans les nombreuses situations où la concentration cérébrale d'ACh endogène se trouve accrue, comme lors de la peur ou l'attention immédiate (Acquas *et al.*, 1996), du stress (Moor *et al.*, 1998), des traitements chroniques à l'oestradiol (Lapchak *et al.*, 1990) ou du sevrage de l'alcool

(Imperato, 1998). Ces situations pourraient en effet faciliter la survenue de nouvelles crises, dans le cas d'un individu adulte ayant subi une crise généralisée précoce.

Le sous-type muscarinique M1 semble plus particulièrement impliqué dans la facilitation des décharges épileptiformes dans le néocortex du rat immature et jouerait également un rôle de premier plan dans l'augmentation de l'efficacité de couplage des mAChR aux protéines G à la suite d'une crise PTZ précoce. Du fait que la cascade intracellulaire enclenchée lors de l'activation des mAChR M1 conduit notamment à une élévation de la concentration calcique intracellulaire, ce changement de concentration intracellulaire calcique pourrait être un des mécanismes responsable de l'augmentation subséquente de l'efficacité de couplage des mAChR aux protéines G.



## Chapitre VI

# BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

## RÉFÉRENCES

- Abbes, S., Louvel, J., Lamarche M et Pumain R. (1991) Laminar analysis of the origin of the various components of evoked potentials in slices of rat sensorimotor cortex. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **80**, 310-320.
- Abeles, M. (1991) *Corticonics: Neural circuits of the cerebral cortex*, Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Acquas, E., Wilson C., & Fibiger H.(1996) Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J. Neurosci.*, **16**, 3089-3096.
- Agmon, A., Hollrigel G., & O'Dowd D.(1996) Functional GABAergic synaptic connection in neonatal mouse barrel cortex. *J. Neurosci.*, **16**, 4684-4695.
- Ahmed, B., Anderson, J., Douglas, R., Martin, K. & Nelson, J. (1994) Polyneuronal innervation of spiny stellate neurons in cat visual cortex. *J. Comp. Neurol.*, **341**, 39-49.
- Aicardi, J. & Chevrie J. (1970) Convulsive status epilepticus in infants and children. A study of 239 cases. *Epilepsia*, **11**,187-97.
- Albowitz, B. & Kuhnt U. (1995) Epileptiform activity in the guinea-pig neocortical slice spreads preferentially along supragranular layers--recordings with voltage-sensitive dyes. *Eur. J. Neurosci.*, **7**, 1273-1284.
- Albuquerque, E., Pereira, E., Castro, N., Alkondon, M., Reinhardt, S., Schroder, H. & Maelicke, A. (1995) Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **757**, 48-72.

- Alefeld, M., Sutor, B. & Luhmann, H. (1998) Pattern and pharmacology of propagating epileptiform activity in mouse cerebral cortex. *Exp. Neurol.*, **153**, 113-122.
- Alger, B. & Nicoll, R. (1980) Epileptiform burst afterhyperpolarization: calcium-dependent potassium potential in hippocampal CA1 pyramidal cells. *Science*, **210**, 1122-1124.
- Alkondon, M., Reinhardt, S., Lobron, C., Hermsen, B., Maelicke, A. & Albuquerque E. (1994) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. II. The rundown and inward rectification of agonist-elicited whole-cell currents and identification of receptor subunits by in situ hybridization. *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 494-506.
- Andrew, R. & MacVicar, B. (1994) Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience*, **62**, 371-383.
- Andrew, R., Fagan, M., Ballyk, B. & Rosen, A. (1989) Seizure susceptibility and the osmotic state. *Brain Res.*, **498**, 175-180.
- Aronstam, R., Kellogg, C. & Abood, L. (1979) Development of muscarinic cholinergic receptors in inbred strains of mice: identification of receptor heterogeneity and relation to audiogenic seizure susceptibility. *Brain. Res.*, **162**, 231-341.
- Aubert, I., Cécylre, D., Gauthier, S. & Quirion, R. (1996) Comparative ontogenetic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **369**, 31-55.
- Avoli, M. & Barbarosie, M. (1999) Interictal-ictal interactions and limbic seizure generation. *Rev. Neurol. (Paris)*, **155**, 468-471.

- Avoli, M., Drapeau, C., Louvel, J., Pumain, R., Olivier, A. & Villemure, J. (1991) Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro. *Ann. Neurol.*, **30**, 589-596.
- Avoli, M., Barbarosie, M., Lucke, A., Nagao, T., Lopantsev, V. & Kohling, R. (1996) Synchronous GABA-mediated potentials and epileptiform discharges in the rat limbic system in vitro. *J. Neurosci.*, **16**, 3912-3924.
- Ayala, G., Dichter, M., Gumnit, R., Matsumoto, H. & Spencer, W. (1973) Genesis of epileptic interictal spikes. New knowledge of cortical feedback systems suggests a neurophysiological explanation of brief paroxysms. *Brain Res.*, **52**, 1-17.
- Aznavour, N., Mechawar, N. & Descarries, L. (2002) Comparative analysis of cholinergic innervation in the dorsal hippocampus of adult mouse and rat: a quantitative immunocytochemical study. *Hippocampus*, **12**, 206-217.
- Azouz, R., Jensen, M. & Yaari, Y. (1996) Ionic basis of spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Physiol.*, **492**, 211-223.
- Baldy-Moulinier, M. (1997) *Epilepsies en questions*, Editions John Libbey Eurotext.
- Baran, H., Lassmann, H., Sperk, G., Seitelberger, F. & Hornykiewicz, O. (1987) Effect of mannitol treatment on brain neurotransmitter markers in kainic acid-induced epilepsy. *Neuroscience*, **21**, 679-684.
- Barth, D., Baumgartner, C. & Di, S. (1990) Laminar interactions in rat motor cortex during cyclical excitability changes of the penicillin focus. *Brain Res.*, **508**, 105-117.

- Belliveau, D., Bechberger, J., Rogers, K. & Naus, C. (1997) Differential expression of gap junctions in neurons and astrocytes derived from P19 embryonal carcinoma cells. *Dev. Genet.*, **21**, 187-200.
- Ben-Ari, Y., Tseeb, V., Ragozzino, D., Khazipov, R. & Gaiarsa, J. (1994) gamma-Aminobutyric acid (GABA): a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. *Prog. Brain Res.*, **102**, 261-273.
- Berry, M. & Pentreath, V. (1976) Criteria for distinguishing between monosynaptic and polysynaptic transmission. *Brain Res.*, **105**, 1-20.
- Binmoller, F. & Muller, C. (1992) Postnatal development of dye-coupling among astrocytes in rat visual cortex. *Glia*, **6**, 127-137.
- Blackstad, T. & Flood, P. (1963). Ultrastructure of hippocampal axo-somatic synapses. *Nature*, **198**, 542-543.
- Bonner, T., Buckley, N., Young, A. & Brann, M. (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science*, **237**, 527-532.
- Bragin, A., Engel, J.Jr, Wilson, C., Vizenin, E. & Mathern, G. (1999a) Electrophysiologic analysis of a chronic seizure model after unilateral hippocampal KA injection. *Epilepsia*, **40**, 1210-1221.
- Bragin, A., Engel, J.Jr, Wilson, C., Fried, I. & Mathern, G. (1999b) Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100-500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid-treated rats with chronic seizures. *Epilepsia*, **40**, 127-137.

- Brown, D., Abogadie, F., Allen, T., Buckley, N., Caulfield, M., Delmas, P., Haley, J., Lamas, J. & Selyanko, A. (1997) Muscarinic mechanisms in nerve cells. *Life Sci.*, **60**, 1137-1144.
- Buwalda, B., De Groote, L., Van der Zee, E., Matsuyama, T., Luiten, P. (1995) Immunocytochemical demonstration of developmental distribution of muscarinic acetylcholine receptors in rat parietal cortex. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **84**, 185-191.
- Buzsaki, G. (1996) The hippocampo-neocortical dialogue. *Cereb. Cortex*, **6**, 81-92.
- Bymaster, F., Carter, P., Yamada, M., Gomeza, J., Wess, J., Hamilton, S., Nathanson, N., McKinzie, D. & Felder, C. (2003) Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 1403-1410.
- Cajal, S.R.Y. (1911) *Histologie Du Système Nerveux de l'Homme et Des Vertébrés*, Maloine (Paris)
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A. & Bernardi, G. (1998) Blockade of M2-like muscarinic receptors enhances long-term potentiation at corticostriatal synapses." *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 3020-3023.
- Carlen, P., Skinner, F., Zhang, L., Naus, C., Kushnir, M. & Perez-Velazquez, J. (2000) The role of gap junctions in seizures. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **32**, 235-241.
- Carter, C. (1962) Status epilepticus treated by intravenous urea. *Epilepsia*, **3**, 198-200.
- Cartmell, J., Curtis, A., Kemp, J., Kendall, D. & Alexander, S. (1993) Subtypes of metabotropic excitatory amino acid receptor distinguished by stereoisomers of

- the rigid glutamate analogue, 1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylate. *Neurosci. Lett.*, **153**, 107-110.
- Caulfield, M. (1993) Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol. Ther.*, **58**, 319-379.
- Chagnac-Amitai, Y. & Connors, B. (1989) Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J. Neurophysiol.*, **62**, 1149-1162.
- Chamberlin, N., Traub, R. & Dingledine, R. (1990) Role of EPSPs in initiation of spontaneous synchronized burst firing in rat hippocampal neurons bathed in high potassium. *J. Neurophysiol.*, **64**, 1000-1008.
- Changeux, J., Bertrand, D., Corringier, P., Dehaene, S., Edelstein, S., Lena, C., Le Novere, N., Marubio, L., Picciotto, M. & Zoli, M. (1998) Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **26**, 198-216.
- Chen, G., Trombley, P. & Van den Pol, A. (1996) Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J. Physiol.*, **494**, 451-464.
- Chervin, R., Pierce, P., Connors, B. (1988) Periodicity and directionality in the propagation of epileptiform discharges across neocortex. *J. Neurophysiol.*, **60**, 1695-1713.
- Clarke, P., Schwartz, R., Paul, S., Pert, C. & Pert, A. (1985) Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [3H]acetylcholine, [3H]nicotine, and [125I]-alpha-bungarotoxin. *J. Neurosci.*, **5**, 1307-1315.

- Cobb, S., Buhl, E., Halasy, K., Paulsen, O. & Somogyi, P. (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*, **378**, 75-8.
- Cole, A. & Nicoll, R. (1984) Characterization of a slow cholinergic post-synaptic potential recorded in vitro from rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.*, **352**, 173-188.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989) Proposal for a revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, **30**, 389-399.
- Commission on Pediatric Epilepsy of the International League Against Epilepsy (1997) Myoclonus and epilepsy in childhood. *Epilepsia*, **38**, 1251-1254.
- Condorelli, D., Parenti, R., Spinella, F., Trovato Salinaro, A., Belluardo, N., Cardile, V. & Cicirata, F. (1998) Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 1202-1208.
- Connors, B. (1984) Initiation of synchronized neuronal bursting in neocortex. *Nature*, **310**, 685-687.
- Connors, B., Gutnick, M. & Prince, D. (1982) Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. *J. Neurophysiol.*, **48**, 1302-1320.
- Connors, B., Benardo, L. & Prince, D. (1983) Coupling between neurons of the developing rat neocortex. *J. Neurosci.*, **3**, 773-782.
- Cortes, R. & Palacios, J. (1986) Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the rat brain. I. Quantitative autoradiographic studies. *Brain Res.*, **362**, 227-238.



- Cox, C., Metherate, R. & Ashe, J. (1994) Modulation of cellular excitability in neocortex: muscarinic receptor and second messenger-mediated actions of acetylcholine. *Synapse*, **16**, 123-136.
- Cozzari, C. H. & J. Hartman, B. (1990) Analysis of epitopes on choline acetyltransferase (ChAT) using monoclonal antibodies (Mabs). *Soc. Neurosci. Abstr.*, **16**, 200.
- Dallanocce, C., Conti, P., De Amici, M., De Micheli, C., Barocelli, E., Chiavarini, M., Ballabeni, V., Bertoni, S. & Impicciatore, M. (1999) Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 1539-1547.
- De Curtis, M. & Avanzini, G. (2001) Interictal spikes in focal epileptogenesis. *Prog. Neurobiol.*, **63**, 541-567.
- De Curtis, M., Radici, C. & Forti, M.. (1999) Cellular mechanisms underlying spontaneous interictal spikes in an acute model of focal cortical epileptogenesis. *Neuroscience*, **88**, 107-117.
- De Sevilla, D., Cabezas, C., De Prada, A., Sanchez-Jimenez, A. & Buno, W. (2002) Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.*, **545**, 51-63.
- Deisz R. (1982) The neocortical slice. *Practical Electrophysiological Methods: A Guide for In Vitro Studies in Vertebrate Neurobiology*. G. R. Kettenmann H., Wiley-Liss.

- Deisz, R. & Prince, D. (1989) Frequency-dependent depression of inhibition in guinea-pig neocortex in vitro by GABAB receptor feed-back on GABA release. *J. Physiol.*, **412**, 513-541.
- Del Rio, J., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M. & Soriano, E. (1997) A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*, **385**, 70-74.
- Descarries, L., Mechawar, N., Aznavour, N. & Watkins, K. (2004) Structural determinants of the roles of acetylcholine in cerebral cortex. *Prog. Brain Res.*, **145**, 45-58.
- Dichter, M. (1993) 1992 William Lennox Lecture American Epilepsy Society annual meeting. The premise, the promise, and the problems with basic research in epilepsy. *Epilepsia*, **34**, 791-799.
- Dicker, F., Quitterer, U., Winstel, R., Honold, K. & Lohse, M. (1999) Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 5476-5481.
- Dingledine, R., McBain, C. & McNamara, J. (1990) Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 334-338.
- Dorje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E. & Brann, M. (1991) Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**, 727-733.

- Douglas, R. & Martin, K. (1998) Neocortex. *The synaptic organization of the brain*, 4th Ed., Gordon Shepherd, Oxford University Press. NY: 459-559.
- Dreier, J. & Heinemann, U. (1991) Regional and time dependent variations of low Mg<sup>2+</sup> induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Exp. Brain Res.*, **87**, 581-596.
- Dudek, F., Yasumura, T. & Rash, J. (1998) 'Non-synaptic' mechanisms in seizures and epileptogenesis. *Cell Biol. Int.*, **22**, 793-805.
- Dunwiddie, T. (1999) Adenosine and suppression of seizures. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 3rd ed. W. W. Delgado-Escueta AV, Olsen RW, Porter RJ. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins., 1001-1010.
- During, M. & Spencer, D. (1993) Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet*, **341**, 1607-1610.
- Dzhala, V. & Staley, K. (2003) Transition from interictal to ictal activity in limbic networks in vitro. *J. Neurosci.*, **23**, 7873-7880.
- Ebersole, J. & Chatt, A. (1984) Laminar interactions during neocortical epileptogenesis. *Brain Res.*, **298**, 253-271.
- Eckenstein, F., Baughman, R. & Quinn, J. (1988) An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience*, **25**, 457-474.
- Eichenbaum, H. (1999) The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav. Brain Res.* **103**, 123-133.
- Elgoyhen, A., Johnson, D., Boulter, J., Vetter, D. & Heinemann, S. (1994) Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*, **79**, 705-715.

- Ellenberg, J., Hirtz, D. & Nelson, K. (1984) Age at onset of seizures in young children. *Ann. Neurol.*, **15**, 127-134.
- Elul, R. (1964) Regional Differences in the Hippocampus of the Cat. I. Specific Discharge Patterns of the Dorsal and Ventral Hippocampus and Their Role in Generalized Seizures. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **16**, 470-488.
- Emson, P., Gilbert, R., Loren, I., Fahrenkrug, J., Sundler, F. & Schaffalitzky de Muckadell, O. (1979) Development of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) containing neurones in the rat brain. *Brain Res.*, **177**, 437-444.
- Epilepsy Foundation of America (1975) *Basic statistics on the epilepsies*. Philadelphia, Davis F.A.
- Épilepsie Canada, <http://www.epilepsy.ca/fran/mainSetFR.html>
- Esplin, D. & Woodbury, D. (1956) The fate and excretion of C14-labeled pentylenetetrazol in the rat, with comments on analytical methods for pentylenetetrazol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **118**, 129-138.
- Exton, J. (1994) Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol.*, **56**, 349-369.
- Felder, C. (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *Faseb. J.*, **9**, 619-625.
- Felder, C., Bymaster, F., Ward, J. & DeLapp, N. (2000) Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J. Med. Chem.*, **43**, 4333-4353.
- Ferencz, I., Kokaia, M., Keep, M., Elmer, E., Metsis, M., Kokaia, Z. & Lindvall, O. (1997) Effects of cholinergic denervation on seizure development and

- neurotrophin messenger RNA regulation in rapid hippocampal kindling. *Neuroscience*, **80**, 389-399.
- Ferencz, I., Leanza, G., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Kokaia, M. & Lindvall, O. (2001) Septal cholinergic neurons suppress seizure development in hippocampal kindling in rats: comparison with noradrenergic neurons. *Neuroscience*, **102**, 819-832.
- Ferguson, J. & Jasper, H. (1971) Laminar DC studies of acetylcholine-activated epileptiform discharge in cerebral cortex. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **30**, 377-390.
- Frankenhaeuser, B. & Hodgkin, A. (1957) The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J. Physiol.*, **137**, 218-244.
- Freund, T. & Meskenaite, V. (1992) gamma-Aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 738-742.
- Gage, F., Bjorklund, A. & Stenevi, U. (1983) Reinnervation of the partially deafferented hippocampus by compensatory collateral sprouting from spared cholinergic and noradrenergic afferents. *Brain Res.*, **268**, 27-37.
- Ganguly, K., Schinder, A., Wong, S. & Poo, M. (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*, **105**, 521-532.
- Gardner, C. & Webster, R. (1977) Convulsant-anticonvulsant interactions on seizure activity and cortical acetylcholine release. *Eur. J. Pharmacol.*, **42**, 247-256.

- Gerzanich, V., Anand, R. & Lindstrom, J. (1994) Homomers of alpha 8 and alpha 7 subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrasting binding site properties. *Mol. Pharmacol.*, **45**, 212-220.
- Gilbert, C. (1992) Horizontal integration and cortical dynamics. *Neuron*, **9**, 1-13.
- Gilman, A., Rall, T., Nies, A. & Taylor, P (1990). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed. New York, Pergamon Press.
- Gnagey, A., Seidenberg, M. & Ellis, J. (1999) Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.*, **56**, 1245-1253.
- Goldman, P. & Nauta, W. (1977) Columnar distribution of cortico-cortical fibers in the frontal association, limbic, and motor cortex of the developing rhesus monkey. *Brain Res.*, **122**, 393-413.
- Gotman, J. (1991) Relationships between interictal spiking and seizures: human and experimental evidence. *Can. J. Neurol. Sci.*, **18**, 573-576.
- Gray, H. (1954) *Anatomy of the Human Body*, 26th ed. Philadelphia, Lea & Fibiger.
- Gritti, I., Mainville, L., Mancina, M. & Jones, B. (1997) GABAergic and other noncholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat. *J.Comp. Neurol.*, **383**, 163-77.
- Gruslin, E., Descombes, S. & Psarropoulou, C. (1999) Epileptiform activity generated by endogenous acetylcholine during blockade of GABAergic inhibition in immature and adult rat hippocampus. *Brain Res.*, **835**, 290-297.

- Gutnick, M. & Prince, D. (1981) Dye coupling and possible electrotonic coupling in the guinea pig neocortical slice. *Science*, **211**, 67-70.
- Haas, C., Dudeck, O., Kirsch, M., Huszka, C., Kann, G., Pollak, S., Zentner, J. & Frotscher, M. (2002) Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.*, **22**, 5797-5802.
- Haberer, L. & Pollack, G. (1991) Central nervous system uptake kinetics of pentylentetrazol in the developing rat. *Biopharm. Drug Dispos.*, **12**, 59-71.
- Hablitz, J. (1984) Picrotoxin-induced epileptiform activity in hippocampus: role of endogenous versus synaptic factors. *J. Neurophysiol.*, **51**, 1011-1027.
- Haga, K., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., Shiozaki, K. & Uchiyama, H. (1996) Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2776-2282.
- Haglund, M. & Schwartzkroin, P. (1990) Role of Na-K pump potassium regulation and IPSPs in seizures and spreading depression in immature rabbit hippocampal slices. *J. Neurophysiol.*, **63**, 225-239.
- Hahn, R. & Campbell, D. (1983) Simple shifts in the voltage dependence of sodium channel gating caused by divalent cations. *J. Gen. Physiol.*, **82**, 785-805.
- Halonen, T., Pitkanen, A., Partanen, J., Hyttinen, J. & Riekkinen, P. (1992) Amino acid levels in cerebrospinal fluid of rats after administration of pentylentetrazol. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **101**, 21-25.
- Hamilton, S., Loose, M., Qi, M., Levey, A., Hille, B., McKnight, G., Idzerda, R. & Nathanson, N. (1997) Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic

- receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 13311-13316.
- Hauser, W., Annegers, J. & Kurland, L. (1991) Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. *Epilepsia*, **32**, 429-445.
- Hauser, W., Annegers, J. & Kurland L. (1993) Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia*, **34**, 453-468.
- Heinemann, U., Arens, J., Dreier, J., Stabel, J. & Zhang, C. (1991) In vitro epileptiform activity: role of excitatory amino acids. *Epilepsy Res.*, **10**, 18-23.
- Hochman, D., Baraban, S., Owens, J. & Schwartzkroin, P. (1995) Dissociation of synchronization and excitability in furosemide blockade of epileptiform activity. *Science*, **270**, 99-102.
- Hoffman, W. & Haberly, L. (1991) Bursting-induced epileptiform EPSPs in slices of piriform cortex are generated by deep cells. *J. Neurosci.*, **11**, 2021-2031.
- Hoffman, S. & Prince, D. (1995) Epileptogenesis in immature neocortical slices induced by 4-aminopyridine. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **85**, 64-70.
- Hogg, R., Raggenbass, M. & Bertrand, D. (2003) Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **147**, 1-46.
- Holmes, G. (2002) Seizure-induced neuronal injury: animal data. *Neurology*, **59**, S3-6.
- Hosey, M., DebBurman, S., Pals-Rylaarsdam, R., Richardson, R. & Benovic, J. (1996) The role of G-protein coupled receptor kinases in the regulation of muscarinic cholinergic receptors. *Prog. Brain Res.*, **109**, 169-179.
- Hotson, J. & Prince, D. (1980) A calcium-activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, **43**, 409-419.



- Hubel, D. & Wiesel, T. (1977) Ferrier lecture. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **198**, 1-59.
- Hulme, E. (1990) Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **44**, 39-54.
- Hunt R., & Taveau, R. (1906) On the physiological action of certain choline derivatives and new methods for detecting cholin. *Br. Med. J.*, **2**, 1788-1791.
- Hwa, G., Avoli, M., Oliver, A. & Villemure, J. (1991) Bicuculline-induced epileptogenesis in the human neocortex maintained in vitro. *Exp. Brain Res.*, **83**, 329-339.
- Ilouz, N., Branski, L., Parnis, J., Parnas, H. & Linial, M. (1999) Depolarization affects the binding properties of muscarinic acetylcholine receptors and their interaction with proteins of the exocytic apparatus. *J. Biol. Chem.*, **274**, 29519-29528.
- Imperato, A., Dazzi, L., Carta, G., Colombo, G. & Biggio, G. (1998) Rapid increase in basal acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats induced by withdrawal from long-term ethanol intoxication. *Brain Res.*, **784**, 347-350.
- Ishijima, B., Hori, T., Yoshimasu, N., Fukushima, T. & Hirakawa, K. (1975) Neuronal activities in human epileptic foci and surrounding areas. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **39**, 643-650.
- Izquierdo, I. (1975) The hippocampus and learning. *Prog. Neurobiol.*, **5**, 37-75.
- Jefferys, J. (1990) Basic mechanisms of focal epilepsies. *Exp. Physiol.*, **75**, 127-162.
- Jefferys, J. (1995) Gap junctions and diseases of the nervous system. *Trends Neurosci.*, **18**, 520-521.

- Jefferys, J. & Haas, H. (1982) Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature*, **300**, 448-450.
- Jensen, F. (1999) Acute and chronic effects of seizures in the developing brain: experimental models. *Epilepsia*, **40**, S51-8; discussion S64-6.
- Jensen, M. & Yaari, Y. (1988) The relationship between interictal and ictal paroxysms in an in vitro model of focal hippocampal epilepsy. *Ann. Neurol.*, **24**, 591-598.
- Jinno, S. & Kosaka, T. (2003) Patterns of expression of neuropeptides in GABAergic nonprincipal neurons in the mouse hippocampus: Quantitative analysis with optical disector. *J. Comp. Neurol.*, **461**, 333-349.
- Jones, E.G. (1985) *The thalamus*, Plenum Press (New York)
- Jones, R. & Heinemann, U. (1987) Abolition of the orthodromically evoked IPSP of CA1 pyramidal cells before the EPSP during washout of calcium from hippocampal slices. *Exp. Brain Res.*, **65**, 676-680.
- Johnston, D. & Amaral, D. (1998) Hippocampus, *The synaptic organization of the brain*, 4<sup>th</sup> edition, Gordon Shepherd, Oxford University Press, 417-459
- Karler, R., Cely, W. & Turkanis, S. (1974) Anticonvulsant properties of delta 9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids. *Life Sci.*, **15**, 931-947.
- Karlin, A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 102-114.
- Katz, A., Wu, D. & Simon, M. (1992) Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature*, **360**, 686-689.

- Kohling, R., Vreugdenhil, M., Bracci, E. & Jefferys, J. (2000) Ictal epileptiform activity is facilitated by hippocampal GABAA receptor-mediated oscillations. *J. Neurosci.*, **20**, 6820-6829.
- Kokka, N., Sapp, D., Witte, U. & Olsen, R. (1992) Sex differences in sensitivity to pentylenetetrazol but not in GABAA receptor binding. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **43**, 441-447.
- Konnerth, A., Heinemann, U. & Yaari, Y. (1984) Slow transmission of neural activity in hippocampal area CA1 in absence of active chemical synapses. *Nature*, **307**, 69-71.
- Kriegstein, A., Suppes, T. & Prince, D. (1987) Cellular and synaptic physiology and epileptogenesis of developing rat neocortical neurons in vitro. *Brain Res.*, **431**, 161-171.
- Krnjevic, K. & Silver, A. (1965) A histochemical study of cholinergic fibres in the cerebral cortex. *J. Anat.*, **99**, 711-759.
- Krnjevic, K., Pumain, R. & Renaud, L. (1971) The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex. *J. Physiol.*, **215**, 247-268.
- Kubova, H. & Moshe, S. (1994) Experimental models of epilepsy in young animals. *J. Child Neurol.*, **9**, S3-11.
- Kumar, N. & Gilula, N. (1996) The gap junction communication channel. *Cell*, **84**, 381-388.
- Lapchak, P., Araujo, D., Quirion, R. & Beaudet, A. (1990) Chronic estradiol treatment alters central cholinergic function in the female rat: effect on choline acetyltransferase activity, acetylcholine content, and nicotinic autoreceptor function. *Brain Res.*, **525**, 249-255.

- Lautens, L., Chiou, X., Sharp, J., Young, W.3rd, Sprague, D., Ross, L., Felder, C. (1998) Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) distribution in murine brain and functional studies indicate that cPLA2 does not participate in muscarinic receptor-mediated signaling in neurons. *Brain Res.*, **809**, 18-30.
- Lazareno, S. & Birdsall, N. (1993) Pharmacological characterization of acetylcholine-stimulated [<sup>35</sup>S]-GTP gamma S binding mediated by human muscarinic m1-m4 receptors: antagonist studies. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 1120-1127.
- Lazartigues, E., Brefel-Courbon, C., Tran, M., Montastruc, J. & Rascol, O. (1999) Spontaneously hypertensive rats cholinergic hyper-responsiveness: central and peripheral pharmacological mechanisms. *Br. J. Pharmacol.*, **127**, 1657-1665.
- Levey, A., Kitt, C., Simonds, W., Price, D. & Brann M. (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.*, **11**, 3218-3226.
- Levey, A., Edmunds, S., Heilman, C., Desmond, T. & Frey, K. (1994) Localization of muscarinic m3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neuroscience*, **63**, 207-221.
- Levey, A., Edmunds, S., Koliatsos, V., Wiley, R. & Heilman, C. (1995) Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J. Neurosci.*, **15**, 4077-4092.
- Lewin, E. & Bleck, V. (1981) Electroshock seizures in mice: effect on brain adenosine and its metabolites. *Epilepsia*, **22**, 577-581.

- Linial, M., Ilouz, N. & Parnas, H. (1997) Voltage-dependent interaction between the muscarinic ACh receptor and proteins of the exocytic machinery. *J. Physiol.*, **504**, 251-258.
- Lister, R. & Durcan, M. (1989) Antagonism of the intoxicating effects of ethanol by the potent benzodiazepine receptor ligand Ro 19-4603. *Brain Res.*, **482**, 141-144.
- Liu, B. & Wu, D. (2004) Analysis of G protein-mediated activation of phospholipase C in cultured cells. *Methods Mol. Biol.*, **237**, 99-102.
- Loffelholz, K. (1996) Muscarinic receptors and cell signalling. *Prog. Brain Res.*, **109**, 191-194.
- Loscher, W. (2002) Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.*, **50**, 105-123.
- Loscher, W., Honack, D., Fassbender, C. & Nolting, B. (1991) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models. *Epilepsy Res.*, **8**, 171-189.
- Lothman, E. (1994) Seizure circuits in the hippocampus and associated structures. *Hippocampus*, **4**, 286-290.
- Lothman, E. & Williamson, J. (1993) Rapid kindling with recurrent hippocampal seizures. *Epilepsy Res.*, **14**, 209-220.

- Lysakowski, A., Wainer, B., Bruce, G. & Hersh, L. (1989) An atlas of the regional and laminar distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in rat cerebral cortex. *Neuroscience*, **28**, 291-336.
- Macdonald, R. & Olsen, R. (1994) GABAA receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.*, **17**, 569-602.
- Maggio, R., Barbier, P., Colelli, A., Salvadori, F., Demontis, G. & Corsini, G. (1999) G-protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, 251-257.
- Maguire, E. (2001) Neuroimaging, memory and the human hippocampus. *Rev. Neurol. (Paris)*, **157**, 791-794.
- Marchi, M. & Raiteri, M. (1989) Interaction acetylcholine-glutamate in rat hippocampus: involvement of two subtypes of M2 muscarinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**, 1255-1260.
- Marchi, M., Augliera, A., Codignola, A., Lunardi, G., Fedele, E., Fontana, G. & Raiteri, M. (1991) Cholinergic modulation of [3H]dopamine release from dendrosomes of rat substantia nigra. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **344**, 275-280.
- Mares, P., Kubova, H., Zouhar, A., Folbergrova, J., Koryntova, H. & Stankova, L. (1993) Motor and electrocorticographic epileptic activity induced by 3-mercaptopropionic acid in immature rats. *Epilepsy Res.*, **16**, 11-18.
- Maresova, D., Mares, P. & Trojan, S. (1988) Ontogenetic development of etomidate action in rats. *Act. Nerv. Super. (Praha)* **30**, 75-78.

- Mathern, G., Pretorius, J. & Babb, T. (1995) Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neuron densities in hippocampal and lesional seizures. *J. Neurosurg.*, **82**, 211-219.
- Matsumoto, H. & Marsan, C. (1964) Cortical Cellular Phenomena in Experimental Epilepsy: Interictal Manifestations. *Exp. Neurol.*, **80**, 286-304.
- McBain, C., Traynelis, S. & Dingledine, R. (1990) Regional variation of extracellular space in the hippocampus. *Science*, **249**, 674-677.
- McCarren, M. & Alger, B. (1985) Use-dependent depression of IPSPs in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J. Neurophysiol.*, **53**, 557-571.
- McCormick, D. & Prince, D. (1986) Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex in vitro. *J. Physiol.*, **375**, 169-194.
- McNamara, J. (1994) Cellular and molecular basis of epilepsy." *J. Neurosci.*, **14**, 3413-3425.
- Mechawar, N. & Descarries, L. (2001) The cholinergic innervation develops early and rapidly in the rat cerebral cortex: a quantitative immunocytochemical study. *Neuroscience*, **108**, 555-567.
- Mechawar, N., Cozzari, C. & Descarries, L. (2000) Cholinergic innervation in adult rat cerebral cortex: a quantitative immunocytochemical description. *J. Comp. Neurol.*, **428**, 305-318.
- Medina, A., Manhaes, A. & Schmidt, S. (2001) Sex differences in sensitivity to seizures elicited by pentylentetrazol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **68**, 591-596.

- Meilleur, S., Carmant, L. & Psarropoulou, C. (2000) Immature rat convulsions and long-term effects on hippocampal cholinergic neurotransmission. *NeuroReport*, **11**, 521-524.
- Meilleur, S., Aznavour, N., Descarries, L., Carmant, L., Mamer, O. & Psarropoulou, C. (2003) Pentylentetrazol-induced seizures in immature rats provoke long-term changes in adult hippocampal cholinergic excitability. *Epilepsia*, **44**, 507-517.
- Meissner, W. (1967) Hippocampus and learning. *Int. J. Neuropsychiatry*, **3**, 298-310.
- Meldrum, B. (1990) Anatomy, physiology, and pathology of epilepsy. *Lancet*, **336**, 231-234.
- Meldrum, B., Menini, C., Naquet, R., Laurent, H. & Stutzmann, J. (1979) Proconvulsant, convulsant and other actions of the D- and L-stereoisomers of allylglycine in the photosensitive baboon, *Papio papio*. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **47**, 383-395.
- Merlin, L., Taylor, G. & Wong, R. (1995) Role of metabotropic glutamate receptor subtypes in the patterning of epileptiform activities in vitro. *J. Neurophysiol.*, **74**, 896-900.
- Mesulam, M., Mufson, E., Wainer, B. & Levey, A. (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*, **10**, 1185-1201
- Mingo, N., Cottrell, G., Zhang, L., Wallace, M., Burnham, W. & Eubanks, J. (1997) Kainic acid-induced generalized seizures alter the regional hippocampal expression of the rat m1 and m3 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Epilepsy Res.*, **29**, 71-79.



- Misgeld U. (1992) Hippocampal slices. *Practical Electrophysiological Methods: A Guide for In Vitro Studies in Vertebrate Neurobiology*. G. R. Kettenmann H., Wiley-Liss.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. & Seeburg, P. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, **256**, 1217-1221.
- Moody, W. (1998) The development of voltage-gated ion channels and its relation to activity-dependent development events. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **39**, 159-185.
- Moor, E., Schirm, E., Jacso, J. & Westerink, B. (1998) Involvement of medial septal glutamate and GABAA receptors in behaviour-induced acetylcholine release in the hippocampus: a dual probe microdialysis study. *Brain Res.*, **789**, 1-8.
- Morozov, Y. & Freund, T. (2003) Postnatal development and migration of cholecystinin-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience*, **120**, 923-939.
- Moshe, S. (1987) Epileptogenesis and the immature brain. *Epilepsia*, **28**, S3-15.
- Moshe, S., Albala, B., Ackermann, R. & Engel, J.Jr. (1983) Increased seizure susceptibility of the immature brain. *Brain Res.*, **283**, 81-85.
- Musée Allemand de l'épilepsie, <http://www.epilepsiemuseum.de/alt/museumfr.html>
- Mrzljak, L., Levey, A. & Goldman-Rakic, P. (1993) Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 5194-5198.

- Nadarajah, B., Thomaidou, D., Evans, W. & Parnavelas, J. (1996) Gap junctions in the adult cerebral cortex: regional differences in their distribution and cellular expression of connexins. *J. Comp. Neurol.*, **376**, 326-342.
- Najm, I., Ying, Z., Babb, T., Mohamed, A., Hadam, J., LaPresto, E., Wyllie, E., Kotagal, P., Bingaman, W., Foldvary, N., Morris, H. & Luders, H. (2000) Epileptogenicity correlated with increased N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A/B in human focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, **41**, 971-976.
- Naus, C., Bechberger, J. & Paul, D. (1991) Gap junction gene expression in human seizure disorder. *Exp. Neurol.*, **111**, 198-203.
- Nehlig, A. & Pereira de Vasconcelos, A. (1996) The model of pentylenetetrazol-induced status epilepticus in the immature rat: short- and long-term effects. *Epilepsy Res.*, **26**, 93-103.
- Nò, L. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie* **46**, 113-177.
- Oades, R. (1981) Type of memory or attention? Impairments after lesions of the hippocampus and limbic ventral tegmentum. *Brain Res. Bull.*, **7**, 221-226.
- Offermanns, S., Wieland, T., Homann, D., Sandmann, J., Bombien, E., Spicher, K., Schultz, G. & Jakobs, K. (1994) Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi-type G proteins and Gq/11. *Mol. Pharmacol.*, **45**, 890-898.
- Olsen, R. (1981) The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex. Site of action of convulsant and anticonvulsant drugs. *Mol. Cell. Biochem.*, **39**, 261-279.

- Olsen, R. & Avoli, M. (1997) GABA and epileptogenesis. *Epilepsia*, **38**, 399-407.
- Palacios, J., Niehoff, D. & Kuhar, M. (1979) Ontogeny of GABA and benzodiazepine receptors: effects of Triton X-100, bromide and muscimol. *Brain Res.*, **179**, 390-395.
- Palacios, J., Mengod, G., Vilaro, M., Wiederhold, K., Boddeke, H., Alvarez, F., Chinaglia, G. & Probst, A. (1990) Cholinergic receptors in the rat and human brain: microscopic visualization. *Prog. Brain Res.*, **84**, 243-253.
- Parnavelas, J. (1990) Neurotransmitters in the cerebral cortex. *Prog. Brain Res.*, **85**, 13-29.
- Perez-Velazquez, J., Valiante, T. & Carlen, P. (1994) Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling in epileptogenesis. *J. Neurosci.*, **14**, 4308-4317.
- Perry, D. & Kellar, K. (1995) [<sup>3</sup>H]epibatidine labels nicotinic receptors in rat brain: an autoradiographic study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1030-1034.
- Phillis, J. & Chong, G. (1965) Acetylcholine release from the cerebral and cerebellar cortices: its role in cortical arousal. *Nature*, **207**, 1253-1255.
- Pineau, N., Charriaut-Marlangue, C., Motte, J. & Nehlig, A. (1999) Pentylentetrazol seizures induce cell suffering but not death in the immature rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **112**, 139-144.
- Pitler, T. & Alger, B. (1990) Activation of the pharmacologically defined M3 muscarinic receptor depolarizes hippocampal pyramidal cells. *Brain Res.*, **534**, 257-262.

- Pitler, T. & Alger, B. (1992) Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J. Physiol.*, **450**, 127-142.
- Pohorecki, R., Head, R. & Domino, E. (1988) Effects of selected muscarinic cholinergic antagonists on [3H]acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**, 213-217.
- Prince, D. (1978) Neurophysiology of epilepsy. *Annu. Rev. Neurosci.*, **1**, 395-415.
- Prince, D. (1985) Physiological mechanisms of focal epileptogenesis. *Epilepsia*, **26**, S3-14.
- Prince, D. & Wilder, B. (1967) Control mechanisms in cortical epileptogenic foci. "Surround" inhibition. *Arch. Neurol.*, **16**, 194-202.
- Prince, D. & Connors, B. (1986) Mechanisms of interictal epileptogenesis. *Adv. Neurol.*, **44**, 275-299.
- Prince, D., Jacobs, K., Salin, P., Hoffman, S. & Parada, I. (1997) Chronic focal neocortical epileptogenesis: does disinhibition play a role? *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **75**, 500-507.
- Psarropoulou, C. & Dallaire, F. (1998) Activation of muscarinic receptors during blockade of GABA(A)-mediated inhibition induces synchronous epileptiform activity in immature rat hippocampus. *Neuroscience*, **82**, 1067-1077.
- Psarropoulou, C. & Descombes, S. (1999) Differential bicuculline-induced epileptogenesis in rat neonatal, juvenile and adult CA3 pyramidal neurons in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **117**, 117-120.
- Psarropoulou, C., Beaucher, J. & Harnois, C. (1998) Comparison of the effects of M1 and M2 muscarinic receptor activation in the absence of GABAergic inhibition

- in immature rat hippocampal CA3 area. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **107**, 285-290.
- Qian, J. & Saggau, P. (1997) Presynaptic inhibition of synaptic transmission in the rat hippocampus by activation of muscarinic receptors: involvement of presynaptic calcium influx. *Br. J. Pharmacol.*, **122**, 511-519.
- Racine, R., Rose, P. & Burnham, W. (1977) Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *Can. J. Neurol. Sci.*, **4**, 273-278
- Raiteri, M., Marchi, M., Paudice, P. & Pittaluga, A. (1990) Muscarinic receptors mediating inhibition of gamma-aminobutyric acid release in rat corpus striatum and their pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **254**, 496-501.
- Ramanjaneyulu, R. & Ticku, M. (1984) Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Eur. J. Pharmacol.*, **98**, 337-345.
- Rayport, S. & Kandel, E. (1981) Epileptogenic agents enhance transmission at an identified weak electrical synapse in *Aplysia*. *Science*, **213**, 462-463.
- Reed, D. & Woodbury, D. (1964) The Effect Of Hypertonic Urea Solution On Electroshock Seizure Threshold And Electrolyte Distribution In Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **146**, 154-159.
- Rehavi, M., Skolnick, P. & Paul, S. (1982) Effects of tetrazole derivatives on [3H]diazepam binding in vitro: correlation with convulsant potency. *Eur. J. Pharmacol.*, **78**, 353-356.

- Reid, C., Bekkers, J. & Clements, J. (2003) Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci.*, **26**, 683-687.
- Ribeiro, J., Sebastiao, A. & De Mendonca, A. (2002) Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.*, **68**, 377-392.
- Rorig, B. & Sutor, B. (1996) Regulation of gap junction coupling in the developing neocortex. *Mol. Neurobiol.*, **12**, 225-249.
- Rye, D., Wainer, B., Mesulam, M., Mufson, E. & Saper, C. (1984) Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience*, **13**, 627-643.
- Scherg, M., Bast, T. & Berg, P. (1999) Multiple source analysis of interictal spikes: goals, requirements, and clinical value. *J. Clin. Neurophysiol.*, **16**, 214-224.
- Schrader, J., Wahl, M., Kuschinsky, W. & Kreutzberg, G. (1980) Increase of adenosine content in cerebral cortex of the cat during bicuculline-induced seizure. *Pflugers Arch.*, **387**, 245-251.
- Schroder, H., Zilles, K., Maelicke, A. & Hajos, F. (1989) Immunohisto- and cytochemical localization of cortical nicotinic cholinergic receptors in rat and man. *Brain Res.*, **502**, 287-295.
- Schroder, H., Zilles, K., Luiten, P. & Strosberg, A. (1990) Immunocytochemical visualization of muscarinic cholinergic receptors in the human cerebral cortex. *Brain Res.*, **514**, 249-258.
- Schwartzkroin, P. (1987) In vivo and in vitro microphysiology of focal epilepsy. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl.*, **39**, 177-183.

- Schwartzkroin, P. & Haglund, M. (1986) Spontaneous rhythmic synchronous activity in epileptic human and normal monkey temporal lobe. *Epilepsia*, **27**, 523-533.
- Segal, M. (1989) Presynaptic cholinergic inhibition in hippocampal cultures. *Synapse*, **4**, 305-312.
- Semba, K. (2004) Phylogenetic and ontogenetic aspects of the basal forebrain cholinergic neurons and their innervation of the cerebral cortex. *Prog. Brain Res.*, **145**, 3-43.
- Shapiro, M., Roche, J., Kaftan, E., Cruzblanca, H., Mackie, K. & Hille, B. (2000) Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K(+) channels that underlie the neuronal M current. *J. Neurosci.*, **20**, 1710-1721.
- Sharif, N., Williams, G., DeSantis, L. (1995) Affinities of muscarinic drugs for [3H]N-methylscopolamine (NMS) and [3H]oxotremorine (OXO) binding to a mixture of M1-M4 muscarinic receptors: use of NMS/OXO-M ratios to group compounds into potential agonist, partial agonist, and antagonist classes. *Neurochem. Res.*, **20**, 669-674.
- Shute, C. & Lewis, P. (1963) Cholinesterase-Containing Systems of the Brain of the Rat. *Nature*, **199**, 1160-1164.
- Simburger, E., Stang, A., Kremer, M. & Dermietzel, R. (1997) Expression of connexin43 mRNA in adult rodent brain. *Histochem. Cell Biol.*, **107**, 127-137.
- Singer-Lahat, D., Rojas, E. & Felder, C. (1996) Muscarinic receptor activated Ca<sup>2+</sup> channels in non-excitabile cells. *Prog. Brain Res.*, **109**, 195-199.
- Société Canadienne de Pédiatrie (1996) Traitement du patient pédiatrique en état de mal convulsif à l'urgence. *Paediatrics and child health*, **1**, 156-161.

- Spencer, D.Jr, Horvath, E. & Traber, J. (1986) Direct autoradiographic determination of M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor distribution in the rat brain: relation to cholinergic nuclei and projections. *Brain Res.*, **380**, 59-68.
- Spray, D. (1996) Molecular physiology of gap junction channels. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **23**, 1038-1040.
- Squires, R., Saederup, E., Crawley, J., Skolnick, P. & Paul, S. (1984) Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain. *Life Sci.*, **35**, 1439-1444.
- Steinlein, O., Mulley, J., Propping, P., Wallace, R., Phillips, H., Sutherland, G., Scheffer, I. & Berkovic, S. (1995) A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat. Genet.*, **11**, 201-203.
- Super, H., Perez Sust, P. & Soriano, E. (1997) Survival of Cajal-Retzius cells after cortical lesions in newborn mice: a possible role for Cajal-Retzius cells in brain repair. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **98**, 9-14.
- Sutor, B. (2002) Gap junctions and their implications for neurogenesis and maturation of synaptic circuitry in the developing neocortex. *Results Probl. Cell Differ.*, **39**, 53-73.
- Sutor, B. & Hablitz, J. (1989) Cholinergic modulation of epileptiform activity in the developing rat neocortex. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **46**, 155-160.
- Swann, J., Brady, R. & Martin, D. (1989) Postnatal development of GABA-mediated synaptic inhibition in rat hippocampus. *Neuroscience*, **28**, 551-561.



- Szentagothai, J. (1978) The Ferrier Lecture, 1977. The neuron network of the cerebral cortex: a functional interpretation. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **201**, 219-248.
- Taylor, C. & Dudek, F. (1982) Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science*, **218**, 810-812.
- Telfeian, A. & Connors, B. (1998) Layer-specific pathways for the horizontal propagation of epileptiform discharges in neocortex. *Epilepsia*, **39**, 700-708.
- Tence, M., Cordier, J., Premont, J. & Glowinski, J. (1994) Muscarinic cholinergic agonists stimulate arachidonic acid release from mouse striatal neurons in primary culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **269**, 646-653.
- Tice, M., Hashemi, T., Taylor, L. & McQuade, R. (1996) Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain from postnatal to old age. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **92**, 70-76.
- Toselli, M. & Lux, H. (1989) Opposing effects of acetylcholine on the two classes of voltage-dependent calcium channels in hippocampal neurons. *Exs.*, **57**, 97-103.
- Traub, R. & Wong, R. (1982) Cellular mechanism of neuronal synchronization in epilepsy. *Science*, **216**, 745-747.
- Tribollet, E., Bertrand, D., Marguerat, A. & Raggenbass, M. (2004) Comparative distribution of nicotinic receptor subtypes during development, adulthood and aging: an autoradiographic study in the rat brain. *Neuroscience*, **124**, 405-420.
- Tsau, Y., Guan, L. & Wu, J. (1999) Epileptiform activity can be initiated in various neocortical layers: an optical imaging study. *J. Neurophysiol.*, **82**, 1965-1973.

- Tucek, S. & Proska, J. (1995) Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **16**, 205-212.
- Turner, E. (1969) Hippocampus and memory. *Lancet*, **2**, 1123-1126.
- Turski, W., Czuczwar, S., Kleinrok, Z. & Turski, L. (1983) Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia*, **39**, 1408-1411.
- Umbriaco, D., Watkins, K., Descarries, L., Cozzari, C. & Hartman, B. (1994) Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex: an electron microscopic study in serial sections. *J.Comp. Neurol.*, **348**, 351-373.
- Valenzuela, V. & Benardo, L. (1995) An in vitro model of persistent epileptiform activity in neocortex. *Epilepsy Res*, **21**, 195-204.
- Van der Berg, B. & Yerushalmy, J. (1969) Studies on convulsive disorders in young children. I. Incidence of febrile and nonfebrile convulsions by age and other factors. *Pediatr. Res.*, **3**, 298-304.
- Van der Zee, E. & Luiten, P. (1999) Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog. Neurobiol.*, **58**, 409-471.
- Van der Zee, E., Streefland, C., Strosberg, A., Schroder, H. & Luiten, P. (1992) Visualization of cholinergic neurons in the rat neocortex: colocalization of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **14**, 326-336.
- Van Koppen, C. & Kaiser, B. (2003) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol. Ther.*, **98**, 197-220.

- Velisek, L. & Veliskova, J. (1994) Anticonvulsant action of carbonic anhydrase inhibition. *Sb Lek*, **95** 161-171.
- Velisek, L., Kubova, H., Pohl, M., Stankova, L., Mares, P. & Schickerova, R.. (1992) Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **346**, 588-591.
- Velisek, L., Dreier, J., Stanton, P., Heinemann, U. & Moshe, S. (1994) Lowering of extracellular pH suppresses low-Mg(2+)-induces seizures in combined entorhinal cortex-hippocampal slices. *Exp. Brain Res.*, **101**, 44-52.
- Velisek, L., Veliskova, J. & Moshe, S. (1995) Developmental seizure models. *Ital. J. Neurol. Sci.*, **16**, 127-133.
- Velisek, L., Moshe, S. & Stanton, P. (1996) Increased susceptibility of brain slices from carbonic anhydrase II-deficient mice to low [Mg<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>-induced seizures. *Neurosci. Lett.*, **207**, 143-146.
- Veliskova, J., Velisek, L., Mares, P. & Rokyta, R. (1990) Ketamine suppresses both bicuculline- and picrotoxin-induced generalized tonic-clonic seizures during ontogenesis. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **37**, 667-674.
- Venter, J. (1983) Muscarinic cholinergic receptor structure. Receptor size, membrane orientation, and absence of major phylogenetic structural diversity. *J. Biol. Chem.*, **258**, 4842-4848.
- Vergnes, M., Boehrer, A., He, X., Grenney, H., Dontenwill, M., Cook, J. & Marescaux, C. (2001) Differential sensitivity to inverse agonists of GABA(A)/benzodiazepine receptors in rats with genetic absence-epilepsy. *Epilepsy Res*, **47**, 43-53.

- Vidal, C. & Changeux, J. (1993) Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex in vitro. *Neuroscience*, **56**, 23-32.
- Vincent, S., Kimura, H., McGeer, E. (1981) Organization of substance P fibers within the hippocampal formation demonstrated with a biotin-avidin immunoperoxidase technique. *J. Comp. Neurol.*, **199**, 113-123.
- Vizi, E. (1979) Presynaptic modulation of neurochemical transmission. *Prog. Neurobiol.*, **12**, 181-290.
- Vogt, B. (1984) Afferent specific localization of muscarinic acetylcholine receptors in cingulate cortex. *J. Neurosci.*, **4**, 2191-2199.
- Vohland, H. & Koransky, W. (1972) Effect of -hexachlorocyclohexane on metabolism and excretion of pentetrazol (cardiazol) in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **273**, 99-108.
- Wall, S., Yasuda, R., Li, M., Ciesla, W. & Wolfe, B. (1992) Differential regulation of subtypes m1-m5 of muscarinic receptors in forebrain by chronic atropine administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**, 584-588.
- Wallace, M., Wiley, J., Martin, B. & DeLorenzo, R. (2001) Assessment of the role of CB1 receptors in cannabinoid anticonvulsant effects. *Eur. J. Pharmacol.*, **428**, 51-57.
- Weber, M. (1982), *L'histoire de l'épilepsie*, Conférence Lyonnaise d'histoire de la neurologie et de la psychiatrie, Documentation Oberval.
- Weiland, S., Witzemann, V., Villarroel, A., Propping, P. & Steinlein, O. (1996) An amino acid exchange in the second transmembrane segment of a neuronal

- nicotinic receptor causes partial epilepsy by altering its desensitization kinetics. *FEBS Lett.*, **398**, 91-96.
- Weiss, D. & Hablitz, J. (1984) Interaction of penicillin and pentobarbital with inhibitory synaptic mechanisms in neocortex. *Cell Mol. Neurobiol.*, **4**, 301-317.
- Wong, R., Miles, R. & Traub, R. (1984) Local circuit interactions in synchronization of cortical neurones. *J. Exp. Biol.*, **112**, 169-178.
- Woodbury L. (1977) Incidence and prevalence of seizure disorders including the epilepsies in the USA. A review and analysis of the literature. *Plan for the nationwide action on epilepsy*, DHEW publication, **IV**, 24-77.
- Wolf, N. (1991) Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog. Neurobiol.*, **37**, 475-524.
- Yount, G., Ponsalle, P. & White, J. (1994) Pentylentetrazole-induced seizures stimulate transcription of early and late response genes. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **21**, 219-224.
- Yuste, R. & Katz, L. (1991) Control of postsynaptic Ca<sup>2+</sup> influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron*, **6**, 333-344.
- Zeng, F. & Wess, J. (1999) Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19487-19497.
- Zhou, H., Das, S. & Murthy, K. (2003) Erk1/2- and p38 MAP kinase-dependent phosphorylation and activation of cPLA2 by m3 and m2 receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, **284**, G472-480.

Zouhar, A., Mares, P., Liskova-Bernaskova, K. & Mudrochova, M. (1989) Motor and electrocorticographic epileptic activity induced by bicuculline in developing rats. *Epilepsia*, **30**, 501-510.

